

**Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin**

HABILITATIONSSCHRIFT

Mechanismen des Immunprivilegs im Zentralen Nervensystem nach
axonaler Läsion

**zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu
Berlin**

Herrn Dr. med. Ingo Bechmann

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Thomas Deller
2. Prof. Csaba Leranth, M.D. Ph. D.

eingereicht: 13.12.2001

Datum der Habilitation: 29.05.2001

Zusammenfassung

Myelin-assoziierte Epitope können Ziel destruktiver T-Zell Antworten während autoimmuner Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose oder der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis werden. Dagegen reagieren selbstspezifische T-Zellen nach axonaler Degeneration nicht mit destruktiver Autoimmunität, obwohl die entsprechenden Epitope durch Myelin-phagozytierende Mikroglia präsentiert werden. Im Modell der entorhinalen Kortexläsion von Ratte und Mause zeigten wir, daß Autoimmunität nach solchen Läsionen durch die Expression des Todesliganden CD95L (FasL, Apo1L) auf Astrozyten verhindert wird, da hochaktivierte T-Zellen durch CD95L apoptotisch eliminiert werden. Myelin-phagozytierende Mikroglia reguliert MHC-II und B7-2 hoch, nicht aber das kostimulatorische B7-1 Moleküle, das mit Autoimmunität im Gehirn assoziiert ist. In Zonen retrograder Degeneration, wo Axone am Sproutingprozess beteiligt sind, zeigen Mikrogliazellen bis mindestens 90 Tage nach Läsion einen MHC-II und B7-2 positiven Immunphänotyp. Trotz Anwesenheit von CD4/B7-2 positiven α/β T-Zellen, behält Mikroglia ihre ramifizierte, ruhende Morphologie. Im Gegensatz zu autoimmunen Erkrankungen im Gehirn, erfolgt die Antigenpräsentation nach axonaler Läsion durch Mikroglia also nicht über das B7-1 Molekül. Dies kann der Grund für das Ausbleiben destruktiver Autoimmunität nach axonaler Schädigung sein.

Schlagwörter:

Antigenpräsentation, Immunprivileg, Kostimulation, Multiple Sklerosis

Abstract

Myelin-associated epitopes are targets of destructive T cell responses during autoimmune diseases such as multiple sclerosis (MS) and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). On the other hand, autoimmune T cells do not respond in a destructive way to mechanically-induced axonal degeneration despite myelin phagocytosis and presentation by local microglia. Using entorhinal cortex lesion, a model of axonal degeneration and reactive sprouting, we showed that autoimmunity in the brain is prevented by the expression of the death Ligand CD95L expressed on astrocytes leading to apoptosis of highly activated T cells. Moreover, myelin phagocytosing microglia upregulate MHC-II and B7-2, but lack expression of B7-1, a costimulatory molecule related to destructive immunity. In zones of retrograde axonal degeneration, where axons undergo secondary damage and later contribute to the sprouting response, MHC-II/B7-2 positive microglia are still found at 90 days post lesion. These cells exhibit the ramified morphology of resting microglia in the presence of CD4/B7-2 positive α/β T cells. Thus, in contrast to autoimmune brain disease, axonal degeneration is lacking a signal to induce B7-1 on microglial cells and the recruited T cells do not induce microglial activation. Differences in B7-phenotype of local antigen-presenting cells might provide an explanation for the important finding that autoimmune T cells elicit protective rather than destructive effects following axonal degeneration in the CNS.

Keywords:

antigen-presentation, immune privilege, costimulation, Multiple Sclerosis

Widmung:

Quia nos ad te fecisti et inquietum est cor nostrum
donec requiescat in te.

(Augustinus, Confessiones)

Meiner Schwiegermutter Fatemeh Esmaeili

(1944 -2000)

Abkürzungsverzeichnis

APO1:	Todesligand CD95L
B ₄	Griffonia simplicifolia Isolectin B ₄
B7-1/B7-2	CD80/CD86; kostimulatorische Moleküle
CA	Cornu Ammonis
CD	Cluster of Differentiation
CTLA-4	Ligand von B7; induziert negative Rückkopplung
DAB	Diaminobenzidin
EAE	Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis
ECL	Entorhinal Cortex Lesion
Fas/FasL	Todesligand CD95L
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GFAP	Glia Fibrillary Acidic Proteine
GSI	Griffonia simplicifolia
HRP	Horseradish Peroxidase
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule
LFA	Leukocyte Function Antigen
MBP	Myelin Basisches Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MML	Middle Molecular Layer
MR	Mini Ruby
NGF	Nerve Growth Factor
OML	Outer Molecular Layer
PARV	Parvalbumin
TGF	Tumor growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand
VLA	Very Late Antigen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Vorwort

1 Was ist Immunprivileg ?

Einige Organe des Körpers (vordere Augenkammer, Gehirn, Plazenta, Hoden) zeigen einen immunologischen Sonderstatus reduzierter Aktivierbarkeit des spezifischen und des unspezifischen Immunsystems (Medawar 1948, Streilein 1995). Dieser als *Immunprivileg* bezeichnete Zustand lokaler Immunsuppression drückt sich etwa in verzögerter oder gänzlich unterdrückter Abstoßung allogenetischer Transplantate in diesen Organen aus (Shirai 1921; Medawar 1948), wie es physiologischerweise im Verbleib der immunphänotypisch kindlichen Plazenta im mütterlichen Organismus (also der Toleranz gegenüber einem allogenetischen Transplantat), aber auch im Überleben von Hornhaut- und Linsentransplantaten in der vorderen Augenkammer illustriert wird. Mithilfe von Transplantationsexperimenten konnte zwischen immunprivilegierten Orten (in denen allogenetische Transplantate toleriert werden) und immunprivilegierten Geweben (die ihrerseits gut transplantiert werden können) unterschieden werden (Streilein 1996). Eine Übersicht findet sich in Tabelle 1:

Tabelle 1:

Immunprivilegierte Orte	Immunprivilegierte Gewebe
Auge, insbesondere vordere Kammer	Cornea
Gehirn	Linse
Schwangerer Uterus	Plazenta/Fetus
Hoden	Hoden
Ovar	Ovar
Haarfollikel	Leber
Nebennierenrinde	Knorpel
Tumoren	Tumoren

Neben der evidenten Notwendigkeit von Immunprivileg in der Plazenta ist dessen Funktion auch für einige andere immunprivilegierte Organe und Gewebe zu erkennen: Die Toleranz gegenüber einem Fremdanigen, etwa einem Virus, ist an solchen Orten offenbar für den Gesamtorganismus günstiger als dessen Elimination, die nur zum Preis der T Zell vermittelten Zytolyse lokaler Zellen zu erreichen ist. In schlecht regenerationsfähigen, postmitotischen oder hochgradig differenzierten Geweben ist ein solcher Zellverlust nicht kompensierbar. Deshalb überleben bestimmte Viren im ZNS, da ihre Eliminierung durch T Effektor Zellen unweigerlich neuronalen Zelltod und damit schwere neurologische Defizite oder den Tod des Individuums zur Folge hätte (Cohen und Schwartz 1999). So scheint das gelegentliche Auftreten eines Herpes zoster für das Individuum deutlich harmloser zu sein, als der Verlust spinaler Ganglienzellen als Resultat der Viruselimination. Ähnliches gilt auch für die vordere Augenkammer und den als Träger der Keimzellen besonders schützenswerten Hoden. In regenerationsfähigen Organen, etwa der Haut, ist eine solche Immunsuppression dagegen nicht notwendig, da alle am Gewebeaufbau beteiligten Zellen zur Proliferation und Redifferenzierung fähig sind.

Experimentell belegt wurde die Existenz von Orten immunologischer Toleranz erstmals durch Shirai (1921), der zeigte, daß xenogenetische Tumorzellen sich im Parenchym des Gehirns ungehindert vermehren (Maus Sarkoma Zellen im Gehirn von Ratten), während sie in anderen Organen (z.B. den extraparenchymal gelegenen Liquorräumen) abgestoßen werden. Seither sind zahlreiche Versuche unternommen worden, die zellulären und molekularen Mechanismen des Immunprivilegs aufzuklären. Bisher sind mehrere, in den verschiedenen Organen uneinheitliche, zelluläre und molekulare Kandidaten identifiziert, deren Bedeutung im einzelnen z.B. durch die Verwendung von transgenen und knock-out Mäusen noch evaluiert wird. Diskutiert werden neben mechanischen Gewebsbarrieren als klassischem Konzept (z.B. Blut-Hirn- oder Blut-Hoden-

Schranke; Medawar 1948, siehe 2.2), derzeit vor allem die Expression sogenannter Todesliganden (CD95L, TRAIL, TNF, siehe 2.3.), die Apoptose potentiell gefährlicher T Zellen (Dörr et al., eingereicht; Nitsch et al. 2000) induzieren (Bellgrau et al. 1995; Griffith et al. 1995; Bechmann et al. 1999; Bechmann et al. 2000; Bechmann und Nitsch 2001), sowie eine besondere Form der Antigenpräsentation, die Immuntoleranz erzeugt (Streilein et al. 1985; Wenkel et al. 2000; Brabb et al. 2000; Bechmann et al. 2001a; siehe 3.). Eine solche *Immundeivation* wurde zuerst in der vorderen Augenkammer beschrieben (Kaplan und Streilein 1977; Streilein und Niederkorn 1985). Dort führt die Injektion von Fremdanigenen nicht – wie an anderen Orten des Körpers - zu einer lokalen T Zell Reaktion (Typ IV Immunreaktion), sondern erzeugt eine systemische Toleranz dem inokulierten Antigen gegenüber. Auf diese Weise werden Antigene in der vorderen Augenkammer nicht attackiert und damit der empfindliche Sehapparat vor entzündungsbedingter Schädigung geschützt. Deshalb erlaubt das Immunprivileg der vorderen Augenkammer auch die Transplantation von allogenetischen Linsen und Hornhäuten. Bekannt ist, daß diese Form der Toleranz adoptiv transferiert werden kann, indem Splenozyten von in der vorderen Augenkammer immunisierten Tieren in ein anderes Tier injiziert werden. In splenektomierten Tieren läßt sich Immundeivation in der vorderen Augenkammer nicht induzieren. Diese Befunde (Streilein und Niederkorn 1985) zeigen, daß Antigene aus der vorderen Augenkammer zusammen mit einem Signal, das Immundeivation erzeugt, in der Milz präsentiert werden und legen nahe, daß dadurch regulatorische T Zellen entstehen. Wahrscheinlich ist, daß dieses Signal durch aus dem Auge in die Milz migrierende Dendritischen Zellen übertragen wird (Wenkel et al. 2000).

In der Plazenta wurde kürzlich gezeigt, daß ihr Immunprivileg zusammenbricht durch die systemische Applikation von 1-Methyltryptophan, einem Inhibitor der Indolamin-2,3-deoxygenase (IDO; Munn et al. 1998). Nach der derzeitiger Vorstellung (Munn et al. 1999) führt die Expression dieses Enzyms auf Makrophagen der Plazenta durch Degradation von Tryptophan und damit zu Reduktion der extrazellulären Tryptophankonzentration. Durch den Mangel an dieser energiereichen Aminosäure wird die T Zell Proliferation inhibiert und dadurch die Abstoßung der Plazenta verhindert. Inwieweit die IDO auch zur Aufrechterhaltung des Immunprivilegs anderer Organe beteiligt ist, bleibt abzuwarten. Ihre Expression, Induzierbarkeit und proliferationsinhibierende Funktion wurde von uns gerade beschrieben, ihre Funktion für das Immunprivileg im ZNS wird derzeit untersucht.

Eine Übersicht von Merkmalen und potentiellen Mechanismen immunprivilegierter Orte und Gewebe zeigt Tabelle 2:

Nicht alle diese Merkmale lassen sich in allen Orten und Geweben finden und nicht alle angesprochenen Funktionen sind unumstritten (Restifo et al. 2000; siehe unten). Viele dieser Mechanismen finden sich als *Immune Escape* auch in Tumoren (O'Connel et al. 1997), was deren Überleben und Wachstum u.a. erklären kann.

Tabelle 2:

Merkmal	Funktion
Gewebebarrieren (Blut-Hirn/ Blut-Hoden Schranke)	Erschwerter Zugang für Immunzellen
Keine klassischen Lymphgefäße	Erschwerte Aktivierung von Immunzellen
Interstitielle Flüssigkeit drainiert ins Blut	Erschwerte Lokalisation des Antigens
Reduzierte MHC-I/MHC-II Expression	Keine Antigen-spezifische Interaktion
Keine/defiziente Antigen-präsentierenden Zellen	Keine (behinderte) Antigen-spezifische Interaktion
Konstitutive Expression von Todesliganden	Induktion von T Zell-Apoptose
Immunsuppressives Mikroenviroment(Expression von TGF-β)	Immunsuppression Modifizierte Antigenpräsentation
Differentielle Expression von B7-Molekülen	Modifizierte Antigenpräsentation
Expression der IDO	Inhibition der T Zell Proliferation

Im Zentralen Nervensystem (ZNS) wurde ein Immunprivileg evident durch die bahnbrechenden Experimente von Medawar (1948), der unter anderem für diese Beobachtungen 1960 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde. Medawar transplantierte allogenetische Haut in die subcortikale Region oder die Bauchhaut von Hasen. Er beobachtet, daß die Transplantate im ZNS überlebten, während sie in der Bauchhaut abgestoßen wurden. Wenn allerdings Transplantate ins ZNS und in die Bauchhaut eingesetzt wurden, kam es zur sofortigen Abstoßung beider Gewebestücke. Daraus schloß Medawar, daß Antigene im Gehirn zwar keine Immunantwort induzieren, das ZNS aber nicht prinzipiell immunologisch inert ist, sondern nach peripherer Immunisierung sehr wohl zugänglich für Leukozyten sein muß. Diese Eigenschaft des Immunprivilegs des Gehirns wird im Modell der Experimentellen Allergischen Encephalomyelitis (EAE) ausgenutzt, indem peripher immunogene Antigene des ZNS zusammen mit einem Adjuvans injiziert werden. Wie durch Medawars Experimente vorauszusehen, kommt es im folgenden zur Detektion der entsprechenden Epitope im ZNS und –unter bestimmten Bedingungen bzw. in bestimmten Tierstämmen- zur Entwicklung von autoimmunen Erkrankungen, die in vielfacher Hinsicht der Multiplen Sklerose (MS) ähneln. Aus der Identifikation von Mechanismen, die die akute Inflammation im Gehirn terminieren, lassen sich dann Rückschlüsse auf die Regulation des Immunprivilegs ziehen (Sabelko-Downes et al. 1999).

Wie oben angesprochen sind zahlreiche, insbesondere Myelin-assoziierte Antigene des Gehirns, etwa das Myelin-basische Protein (MBP) potentiell immunogen. Im Einklang mit dem Konzept des Immunprivilegs, aber auch dem Danger-Modell immunologischer Aktivierung (Matzinger 1994; siehe unten) im ZNS induziert das bloße Vorliegen dieser Proteine jedoch keine destruktiven autoimmunen Reaktionen, obwohl für solche Antigene spezifische T Zellen zum physiologischen T Zell Repertoire gehören (Schluesener und Wekerle 1985). Nach peripherer Immunisierung mit Myelinbestandteilen kommt es jedoch zur Aktivierung und Expansion dieser Klone und in der Folge zur Ausbildung einer autoimmunen, demyelinisierenden Erkrankungen. Daher wurde die Präsenz ZNS-Antigen-spezifischer T Zellen bis vor kurzem lediglich im Licht der durch diese Zellen induzierbaren Erkrankungen gesehen. Paradoxe Weise kommt es nach mechanischer axonaler Läsion, trotz des Zerfalls von Myelin und dem damit einhergehenden Vorliegen immunogener Epitope, nicht zum Ausbruch autoimmuner Erkrankungen (Goddin et al. 1999). Ganz im Gegenteil wurde deutlich, daß die selben autoimmunen T Zellen, die gegen das MBP gerichtet sind und nach peripherer Stimulation eine EAE induzieren können, nach mechanischer Läsion protektive Effekte auf sekundär degenerierende Neurone haben können (Moalem et al. 1999). Aus dieser Beobachtung wuchs das Konzept der „Benignen Immunität“ (Schwartz et al. 1999), deren Existenz nunmehr durch einige Untersuchungen bestätigt wurde (Serpe et al. 1999; Hauben et al. 2000; Bechmann et al. 2001). Nach derzeitiger Vorstellung führt die Bindung des T Zell Rezeptors an sein Antigen (im Kontext von MHC-II Molekülen) zur Freisetzung neurotropher Substanzen (Moalem et al. 2000). Es ist jedoch derzeit unklar, aufgrund welcher Signale diese „benigne Immunität“ und nicht eine der EAE ähnliche Immunantwort induziert wird. Die Identifikation solcher Signale war ein wichtiges Ziel dieser Arbeit.

Um zu verstehen, welche Immunantworten durch axonale Degeneration im ZNS induziert werden und warum mechanische axonale Läsionen nicht zu destruktiven Immunantworten führt, haben wir in den letzten Jahren die Immunbiologie anterograder, also axonaler Läsion untersucht (Bechmann und Nitsch 1997a, 1997b; Hailer et al. 1997; Bechmann et al. 1999; Bechmann und Nitsch 2000; Bechmann et al. 2000; Bechmann und Nitsch 2001; Bechmann et al. 2001). Zur Aktivierung des spezifischen Immunsystems gehören zwei Schritte, nämlich 1. die Phagozytose und Prozessierung von Antigenen durch dazu befähigte Antigen-präsentierende Zellen und 2. die Antigen-spezifische Interaktion mit T Lymphozyten, die verschieden geartet und deren Aktivierung oder Anergie zur Folge haben kann (Matzinger 1998; Gallucci et al. 1999). Einen Überblick über diese Interaktion gibt Abbildung 1 (S. 9).

Antigenpräsentierende Zellen interagieren mit Antigen-spezifischen T Zellen über den T Zell Rezeptor (TCR), der das an MHC-II gebundene Antigen erkennt. Die Adhäsion zwischen den Zellen wird u.a. durch Bindung von ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) an LFA-1 (Leucocyte Function Antigen-1) gewährleistet. Das Vorhandensein kostimulatorischer Moleküle ist dann entscheidend für die Induktion von T Zell-Aktivierung oder Deaktivierung, ein Prozeß, der wesentlich durch die Sekretion von Zytokinen beeinflusst wird. Nach gängiger Vorstellung führt die Präsentation von Antigenen über MHC-II (Signal 1) ohne Kostimulation (Signal 2) zu T Zell-Anergie oder Apoptose, während die durch sogenannte *Danger Signals*, also proinflammatorische Zytokine, induzierte Expression von B-7 Molekülen zur T Zell Aktivierung führt (Matzinger 1994, Matzinger 1998, Gallucci 1999). Zumindest für die Antigenpräsentation im ZNS scheint dieser Prozeß

komplizierter zu sein, indem Expression von B7-2 mit protektiven, von B7-1 mit destruktiven Immunantworten im Verlauf entzündlicher Erkrankungen des ZNS in Zusammenhang steht (Kuchroo et al. 1995; Racke et al. 1995; Windhagen et al. 1995; De Simone et al. 1995; Issazadeh et al. 1998; siehe 2.4.5.).

Die Interaktion zwischen Antigenpräsentierender und T Zelle ist in Abbildung 1 dargestellt:

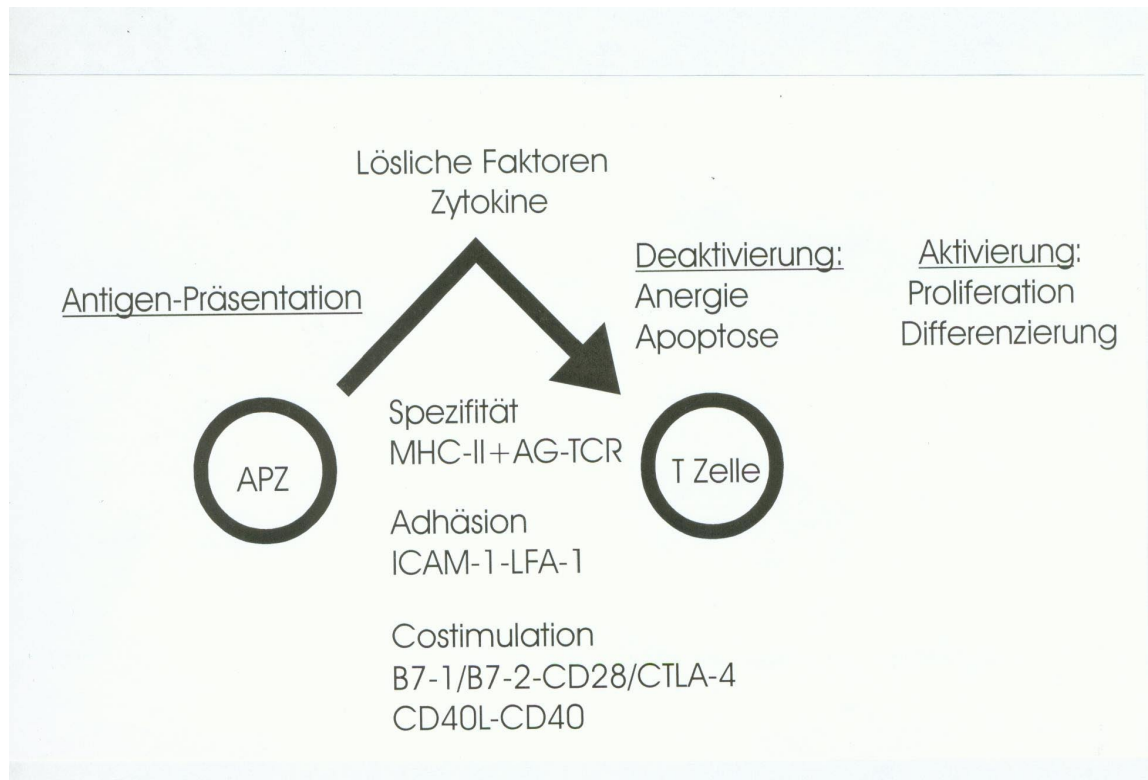


Abbildung 1:

Im Modell der stereotaktischen entorhinalen Läsion der Ratte und der Maus, einem etablierten Paradigma der Degeneration eines myelinisierten Fasertraktes (siehe 2.1.), haben wir in den im folgenden beschriebenen Experimente phagozytische Zellen und deren Interaktion mit T Zellen beschrieben, sowie in vivo und in vitro das Schicksal solcher T Zellen nach Kontakt mit lokalen (Glia-) Zellen untersucht, um zu verstehen, inwieweit die Art lokaler Antigenpräsentation an der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs beteiligt ist. Zudem wurde im gleichen Modell die Invasion von Makrophagen sowie die Expression und Funktion von Todesliganden untersucht, da - wie oben angesprochen - zumindest das CD95/CD95L System in anderen Organen und Geweben wesentlich zu deren Immunprivileg beiträgt. Die Rolle bzw. der Turnover von perivaskulären Makrophagen als potentiell Antigenpräsentierenden Zellen wurde ebenfalls untersucht.

2 Mechanismen des Immunprivilegs im Zentralen Nervensystem nach axonaler Läsion

2.1 Das Modell der entorhinalen Läsion

Eine mechanische Diskonnektion des Hippocampus vom entorhinalen Cortex wird als stereotaktische, elektrolytische entorhinale Läsion tierexperimentell schon lange als Modell zur Untersuchung von De- und Regenerationsprozessen im Zentralen Nervensystem verwendet (Lynch et al. 1972, 1973; Matthews et al. 1976a, 1976b; Cotman und Nadler 1978; Steward und Vinsant 1983). Entorhinale Läsion führt zu anterograder Degeneration im Terminationsgebiet des Tractus perforans, nämlich in der mittleren (MML) und äußeren Molekularschicht (OML) des Gyrus dentatus (vom medialen entorhinalen Cortex projizieren die Axone in die MML, vom lateralen entorhinalen Cortex in die OML) und im Stratum lacunosum-moleculare von CA1 und CA3. Daraus resultiert ein Verlust von ca. 90 % der Synapsen der MML und OML der Fascia dentata ipsilateral zur Läsion (Steward und Vinsant 1983). Einen Überblick über die Verbindung von Hippocampus mit dem entorhinalen Cortex sowie die Hauptzone anterograder Degeneration gibt Abbildung 2.

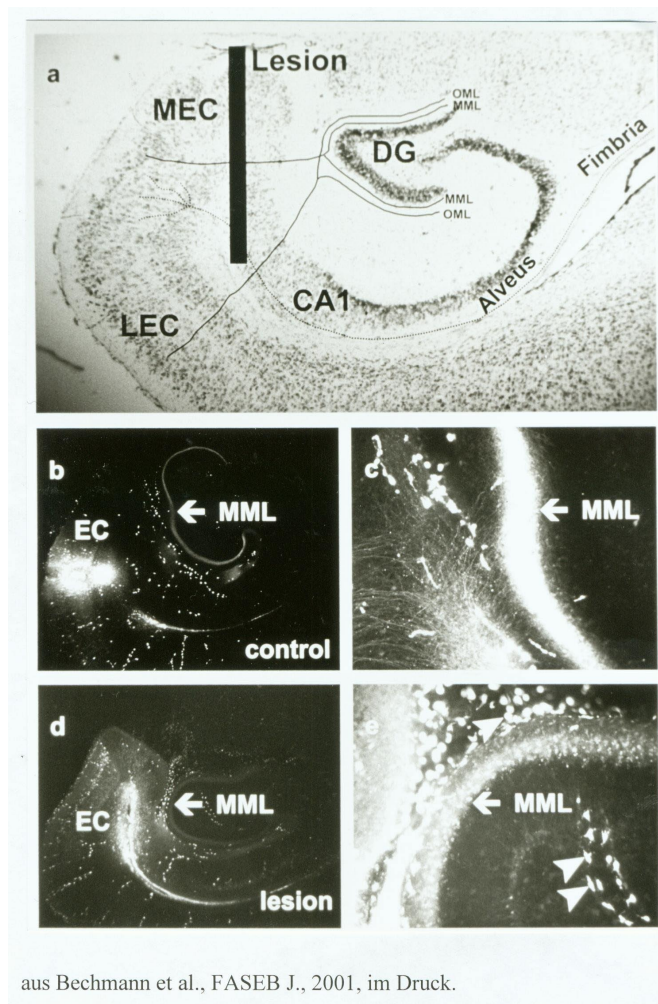


Abbildung 2:

- (a) Hippocampus und entorhinaler Cortex (EC) sind verbunden über den Tractus perforans. Der mediale EC (MEC) terminiert in der mittleren Molekularschicht (MML) des Gyrus dentatus (DG), der laterale (LEC) in der äußeren Molekularschicht (OML).
- (b) Der Fasertrakt kann durch Injektion eines Tracers dargestellt werden.
- (c) Bei hoher Vergrößerung werden die einzelnen Fasern im Terminationsgebiet sichtbar.
- (d) Nach entorhinaler Läsion kommt es zur anterograden Degeneration im Terminationsgebiet.

(e) Die Fasern zerfallen und werden von phagozytischen Zellen aufgenommen.

Innerhalb von 30 Tagen nach Läsion werden die degenerierten Synapsen zu 70 % des Ausgangswertes durch Auswachsen nicht geschädigter Axone ersetzt (Steward und Vinsant 1983), ein Prozeß, der allgemein als reaktive Synaptogenese oder mit dem englischen Terminus als Sprouting, Aussprossen, bezeichnet wird (Raisman 1969). Nach klassischer Auffassung erweitern kommissurale- und Assoziationsfasern, die vorwiegend das innere Drittel der Molekularschicht innervieren, ihre Terminationszone in den denervierten äußeren Teil (Zimmer 1976). Eine aus dem kontralateralen entorhinalen Cortex kreuzende temporohippocampale Projektion in die äußeren zwei Drittel der Molekularschicht expandiert ebenfalls ihre Terminationszone im denervierten Bereich (Steward et al. 1976). Schließlich verdichtet noch eine septale, vorwiegend cholinerge Afferenz des Gyrus dentatus, die die äußeren drei Fünftel der Molekularschicht innerviert, ihre synaptische Dichte (Lynch et al. 1972; Steward und Massenheimer 1978). In jüngerer Zeit konnte gezeigt werden, daß die bisher erarbeiteten Vorstellungen der anatomischen Organisation des entorhinal-hippocampalen Systems der Ratte (Deller et al. 1995a), insbesondere aber der am Sprouting-Prozeß beteiligten Neuronenpopulationen insofern korrekturbedürftig sind, als daß die reaktive Synaptogenese ganz im Gegensatz zur oben beschriebenen Auffassung eher von den verbleibenden Axonen der äußeren Molekularschicht auszugehen scheint, während Fasern der inneren Molekularschicht ihr Terminationsgebiet nicht expandieren (Deller et al. 1995b, 1996, Frotscher et al. 1997; Deller 1998), eventuell weil sie durch gliale Faktoren aktiv vom Einwachsen abgehalten werden (Deller et al. 1997). Diese Entdeckung führte zum Konzept der Schichtenspezifität der reaktiven Synaptogenese nach ECL. Damit wird der oben beschriebene Umstand bezeichnet, daß die Reinnervation der denervierten Dendriten der äußeren Molekularschichten zum größten Teil aus der „eigenen“ Schicht von den dort terminierenden durch die entorhinale Läsion nicht geschädigten Fasern ausgeht (Deller et al. 1995b, 1996; Frotscher et al. 1997; Deller et al. 1997; Deller 1998).

Der Prozeß des Wiedereinwachsens benachbarter Fasern in eine experimentell denervierte Zone wurde weithin als Beispiel für die Regenerationsfähigkeit des ZNS nach Schädigung angesehen (Lynch et al. 1973; Deadwyler et al. 1975; Cotman und Nieto-Sampedro 1985). In der Tat konnte gezeigt werden, daß ein nach unilateraler entorhinaler Läsion der Ratte zu beobachtendes verschlechtertes Lernverhalten sich zwei Wochen nach Läsion wieder normalisierte (Myhrer 1975), also dann, wenn die ursprüngliche synaptische Dichte nahezu wieder erreicht ist (Loesche und Steward 1977; Steward et al. 1977). Dennoch sind dauerhafte transsynaptische (Nitsch und Frotscher 1991, 1993; Nitsch 1993; Miehe et al. 1994; Diekmann und Nitsch 1996) und physiologische (Clusmann et al. 1994) Veränderungen beschrieben. In der Fascia dentata reagieren Parvalbumin (PARV)-positive Neurone, eine Subpopulation GABAerger Nervenzellen, auf entorhinale Läsion mit dauerhafter (bis mindestens ein Jahr nach Läsion beobachtbarer) Rarifizierung ihrer Dendriten aus der früheren Terminationszone des Tractus perforans (Nitsch und Frotscher 1991) und es konnte eine lang dauerhaft gestörte Balance zwischen Exzitation und Inhibition im deafferenzierten Gyrus dentatus auf elektrophysiologischer Ebene nachgewiesen werden. Die Fähigkeit von Körnerzellen, auf orthodrome Stimulation ihrer Afferenz mit Populationsspiques zu reagieren, ist nach Läsion stark reduziert (Clusmann et al. 1994).

Zusammengenommen entsteht der Eindruck, daß die Interpretation der beobachteten Sproutingprozesse als Fähigkeit des ZNS zur funktionellen Reorganisation nach Schädigungen verfrüht war. Zwar konnte reaktive Synaptogenese in verschiedenen experimentellen Läsionsmodellen provoziert und in ihrem Verlauf deskriptiv erfaßt werden. Die molekularen Mechanismen, die Sproutingprozesse initialisieren, steuern und beenden, sowie die biologische Funktion dieses Prozesses bleiben jedoch trotz intensiver Forschung unverstanden. Prinzipiell verschiedene Deutungen des Sprossungsphänomens stehen sich diametral gegenüber: Einerseits könnte die biologische Bedeutung im Wiederherstellen der ursprünglichen Funktion liegen (Myhrer 1975), andererseits gibt es Evidenz, Sprouting als den Versuch zu betrachten, deafferenzierte Neurone zu inhibieren (z.B. Nitsch und Leranth 1994), etwa um damit epileptiforme Potentiale zu verhindern. Eine Aufklärung dieser Fragen ist derzeit nicht in Sicht, was insbesondere deswegen zu bedauern ist, weil ein Verständnis der Prozesse reaktiver Synaptogenese zur Hoffnung auf neue Ansätze in der Therapie der neurodegenerativen Erkrankungen, der epilepsiebedingten Schädigungen, aber auch der durch äußere Gewalt entstandenen Läsionen im ZNS Anlaß geben könnte, nämlich dann, wenn es gelänge, zielgerichtetes Wiederauswachsen zu induzieren bzw. zu transsynaptisch-degenerative Schadenskaskaden zu unterbinden.

Bisher wenig beachtet wurden die immunologischen Reaktionen, die durch entorhinale Läsion

induziert werden. Dabei sind Veränderungen glialer Zellen, die anerkanntermaßen zur Interaktion mit dem spezifischen Immunsystem fähig sind (Übersichtsarbeit: Aloisi et al. 2000), lange bekannt. Übereinstimmend wird eine schon 24h nach Läsion deutlich sichtbare Veränderung der Morphologie und der Verteilung von Mikrogliazellen mit einer Reihe Parametern beschrieben (Gall et al. 1979; Gehrmann et al. 1991; Jensen et al. 1994; Bechmann und Nitsch 1997b; Hailer et al. 1997; Bechmann et al. 2000, Bechmann et al. 2001a, Übersichtsarbeiten: Bechmann und Nitsch 2000, Bechmann und Nitsch 2001). Der Fokus der im folgenden beschriebenen Experimente war deshalb, die immunologischen Reaktionen auf entorhinale Läsion vor dem Hintergrund des aufrechterhaltenen Immunprivilegs zu beschreiben.

2.2 Die Blut-Hirnschranke nach entorhinaler Läsion

Medawar vermutet, daß das Ausbleiben der Abstoßungsreaktion von allogenetischen Transplantaten im ZNS auf zwei morphologische Besonderheiten des ZNS zurückzuführen sei: Einerseits, so glaubte er, sei der efferente Schenkel des Immunsystems im ZNS inhibiert durch die besondere Architektur der Blutgefäße, die eine mechanische Blut-Hirnschranke errichteten, andererseits sei der afferente Schenkel inhibiert durch die Abwesenheit klassischer Lymphgefäße, so daß Antigene aus dem ZNS nicht in die lymphatischen Organe drainierten (Medawar 1948). In den Neunziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde dann deutlich, daß beide Argumente der Hypothese zumindest unzureichend sind; denn zum einen wird selbst das intakte ZNS permanent von aktivierten T Zellen durchquert (Hickey et al. 1991; Wekerle 1993), zum anderen erreichen Antigene aus dem ZNS über die Perineuralscheiden und die Lamina cribrosa die zervikalen Lymphknoten (Cserr und Knopf 1992). Im Modell der entorhinalen Läsion wurde die Frage nach Invasion von Leukozyten nach entorhinaler Läsion bisher wenig beachtet. Fagan und Gage (1994) fanden nach ECL weder periphere Monozyten noch T-Helfer Zellen im Degenerationsgebiet und berichten, daß die Blut-Hirn-Schranke auch für den standardmäßig zur Überprüfung der Dichte der Schranke verwendeten Marker Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase; HRP) undurchdringbar blieb. Jedoch weist diese Studie einige erhebliche Mängel auf: Zur Markierung von Monozyten wurde Dil-markiertes LDL in nur drei Tiere injiziert, die 24h und 72h nach ECL getötet wurden. Dabei bleibt unklar, ob die injizierte Anzahl an Zellen ausreichend war, da eine geeignete Positivkontrolle fehlte, so daß die wichtige Frage, ob periphere Monozyten/Makrophagen, die zur Antigenpräsentation befähigt sind, nach entorhinaler Läsion ins Gewebe eindringen, letztlich nicht beantwortet war. Da sich Makrophagen/Monozyten immunzytochemisch in situ nicht von lokaler Mikroglia unterscheiden lassen, verwendeten wir zur definitiven Beantwortung dieser Frage eine Maus, in die Grün-Fluoreszierendes Protein (GFP)-transfiziertes Knochenmark transplantatiert wurde (Kollaboration mit Dr. Priller, Prof. Dr. Dirnagl, Neurologische Klinik der Charité; für Details der Methode siehe Referenz 9 im Anhang). Zellen aus dem Blut lassen sich in diesen Chimären dann über Monate durch intensive Fluoreszenz erkennen. Dadurch werden neu eingewanderte Makrophagen von residenter Mikroglia unterscheidbar. Abbildung 3 zeigt die von uns mit dieser Methode gefunden Invasion von Makrophagen nach entorhinaler Läsion.

Wie schon in Abbildung 3 zu erkennen, transformierte sich die Morphologie der einwandernden Zellen von einer runden, für Leukozyten typische Form in die typische ramifizierte Gestalt von Mikrogliazellen. Dies ist in der folgenden Abbildung 4 noch deutlicher zu sehen.

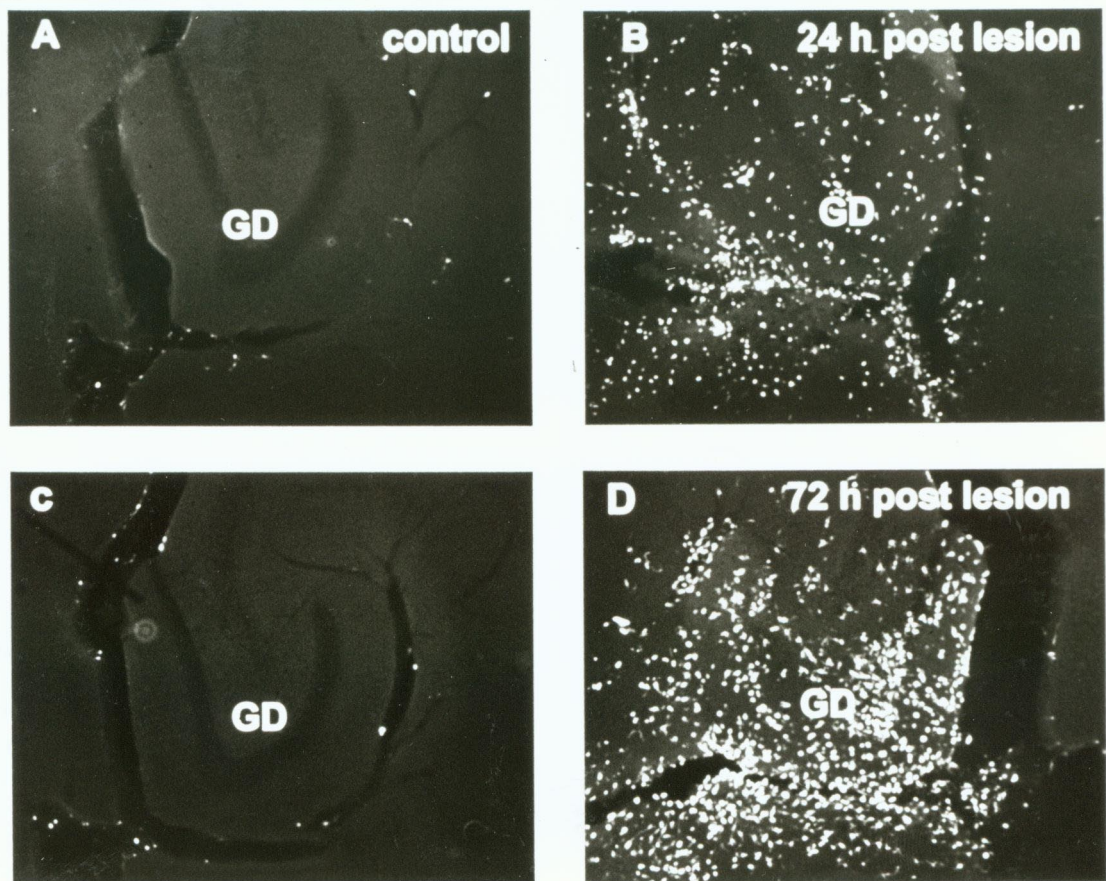


Abbildung 3:

(a, c) Im unladierten Zustand fanden sich lediglich neu eingewanderte Makrophagen in den perivaskulären Räumen (Referenz 9). (b, d) Im ladierten entorhinalen Cortex sowie im denervierten Hippocampus kam es dagegen zur massiven Infiltration innerhalb der ersten 24h nach Läsion. Die Makrophagen transformierten innerhalb von 72h ihre Morphologie zur typischen Gestalt von Mikroglia.

Diese Experimente machen deutlich, daß die sogenannte Blut-Hirn-Schranke kein Hindernis für infiltrierende Leukozyten nach entorhinaler Läsion darstellt. Damit wird zumindest für Bedingungen mechanischer Verletzung deutlich, daß die Vorstellung von Gewebearrrieren als wichtiger Mechanismus des Immunprivilegs (Medawar 1948) unzutreffend ist. Dagegen entwickeln einwandernde Makrophagen die wesentlichen morphologischen Charakteristika ruhender Mikroglia, was auf eine lokale, Zytokin-induzierte Deaktivierung immunkompetenter Zellen als Mechanismus des Immunprivilegs hinweist (Hailer et al. 1998).

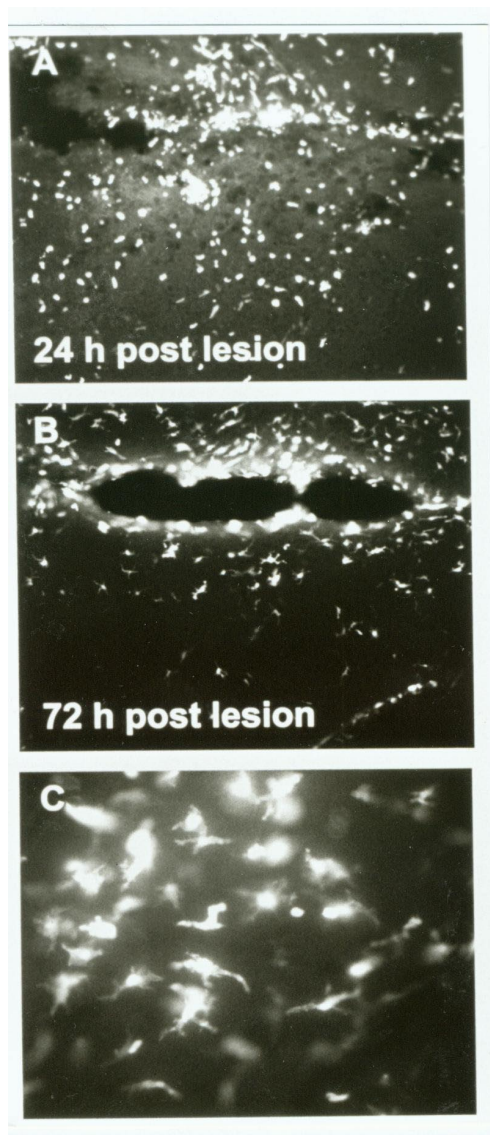


Abbildung 4:
 (a) In der Läsionszone finden sich zahlreiche runde, fluoreszierende Zellen 24h nach Läsion. (b) Ihre Morphologie entspricht 72h nach Läsion der typischen ramifizierten Gestalt von Mikroglia, wie es bei hoher Vergrößerung in (c) klar zu erkennen ist.

2.3 Die Rolle von Todesliganden für das Immunprivileg im ZNS

2.3.1 Das CD95/CD95L System (Referenzen 1-3)

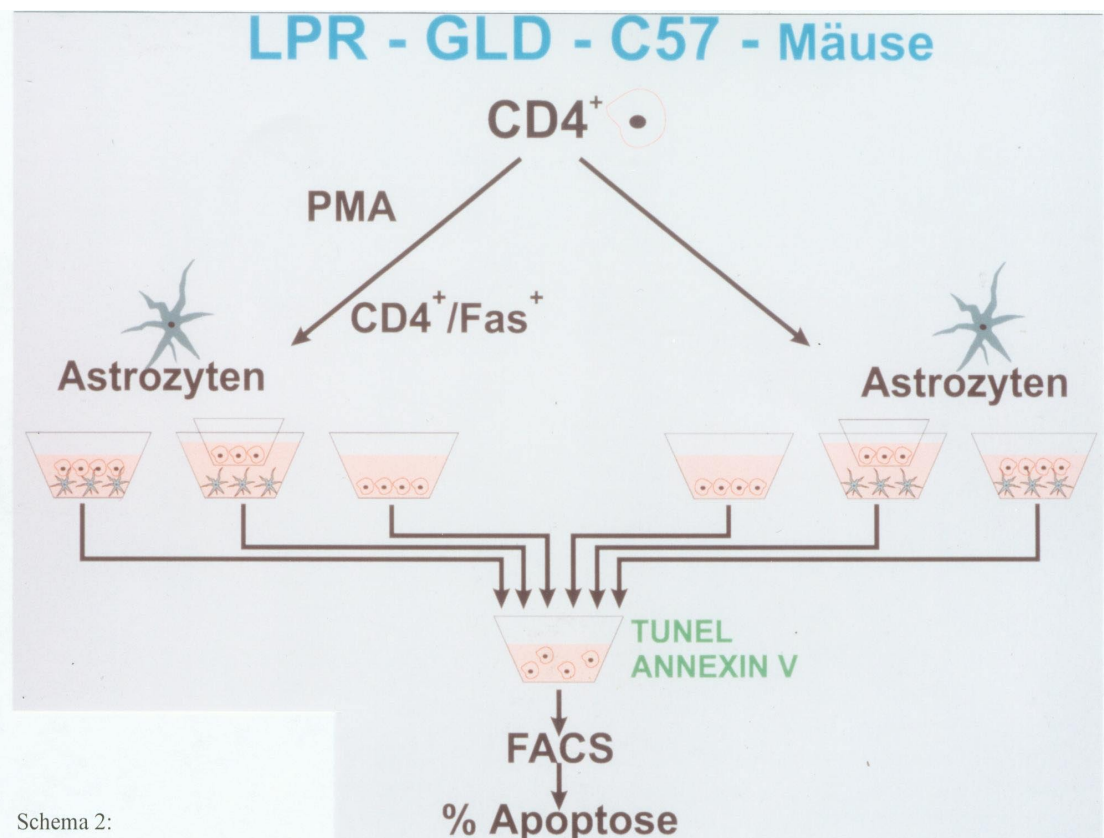
Entscheidende Hinweise zur Beteiligung sogenannter Todesliganden an der Regulation des Immunprivilegs kamen aus Untersuchungen des Hodens (Bellgrau et al. 1995) und der vorderen Augenkammer (Griffith and Ferguson 1997), die zeigten, daß deren Immunprivileg steht und fällt mit der Expression des Todesliganden CD95L (FasL, Apo1L). CD95L gehört zur Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Superfamilie, einer Gruppe von Genen, die für Apoptose-induzierende Liganden codieren. Die Bindung von CD95L an seinen Rezeptor CD95 (Fas, Apo1) induzierte Apoptose der CD95 exprimierenden Zellen. Für T Zellen ist dieser Mechanismus entscheidend für die Homöostase des Zellpools. Nach Aktivierung kommt es auf proliferierenden Zellen zur Hochregulation von Fas und FasL, die gefolgt wird von suizidaler und fratrizidaler Apoptose (Owen-Schaub et al., 1992; Miyawaki et al., 1992). Defekte im Fas- und im FasL-Gen führen daher zur ungehinderten T Zell Proliferation und zur Ausbildung Lupus-ähnlicher autoimmuner Erkrankungen,

wie es in Fas- bzw. FasL-defizienten lpr- und gld-Mäusen illustriert wird (Nagata und Suda 1995).

Um die Rolle von CD95L für das Immunprivileg des ZNS zu evaluieren, haben wir zunächst die Expression mit Hilfe von reverser Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-pcr) zur Detektion der mRNA und mit Western-Blots und Immunzytochemie zum Nachweis und zur zellulären Lokalisation des Proteins untersucht (Bechmann et al. 1999; Bechmann und Nitsch 2001). Wir fanden CD95L im intakten ZNS von Maus, Ratte und Mensch exprimiert auf Neuronen, Mikrogliazellen der weissen Substanz sowie auf Astrozyten der Glia limitans. Diese um Blutgefäße des ZNS gelegene Schicht astrozytärer Fortsätze stellt die erste Struktur des ZNS Parenchyms dar, die von infiltrierenden T Zellen erreicht wird. Nach mechanischen Läsionen kam es zur Hochregulation von CD95L auf Astrozyten, in deren Nähe sich apoptotische Leukozyten fanden, die den CD95 Rezeptor exprimierten. Da solche FasL-positiven Astrozyten auch in vitro in der Lage waren, die Fas-sensitive, humane Jurkat-Zelllinie zu lysieren, interpretierten wir das Vorliegen von FasL auf der Glia limitans als eine Immunologische Blut-Hirn-Schranke (IBB: *Immunologic Brain Barrier*; Bechmann et al. 1999, **Referenz 1**).

Um zu untersuchen, ob CD95L auch an der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs nach axonaler Degeneration beteiligt ist, untersuchten wir die Expression nach entorhinaler Läsion der Ratte. Wir fanden, daß reaktive Astrozyten in der Zone anterograder Degeneration zwischen Tag 5 und 10 nach Läsion verstärkt sowohl Fas als auch FasL exprimieren, selbst aber nicht apoptotisch werden. In der Nähe der FasL-positiven Astrozyten fanden sich häufig Leukozyten mit fragmentierten Kernen, was als Hinweis auf die funktionelle Relevanz von astrozytischen CD95L gedeutet werden kann. (Bechmann et al. 2000, **Referenz 2**).

Da all diese Befunde nur nahelegen, aber nicht beweisen, daß CD95L exprimiert auf Zellen des ZNS an der Regulation des Immunprivilegs beteiligt sind, führten wir Kokultur-Experimente durch, um die Fähigkeit von CD95L-defizienten Astrozyten, Apoptose von T Zellen zu induzieren, mit derjenigen CD95-positiver Astrozyten zu vergleichen. Der methodische Ansatz wird illustriert in Abbildung 5.



Schema 2:

Nach Kokultivierung mit Astrozyten wurden die T Zellen aus dem Medium isoliert und ihre Apoptose mit Hilfe der Tunel, Annexin und der Nicoletti Methode in der Durchflußzytometrie (FACS) bestimmt.

Abbildung 5

Diese Experimente belegen eindeutig, daß der CD95/CD95L Weg eine entscheidende Rolle bei der Induktion von T Zell Apoptose durch Astrozyten spielt (Bechmann et al., eingereicht, **Referenz 3**).

Zusammengenommen unterstützen diese Befunde unsere Hypothese, daß durch die Expression von FasL, die durch entorhinale Läsion noch hochreguliert wird, eine Immunologische Schranke für aktivierte, infiltrierende T Lymphozyten besteht, was eine weitere Aktivierung und damit eine autoreaktive Immunantwort unterdrücken könnte. Dies wird modellhaft in Abbildung 6 illustriert:

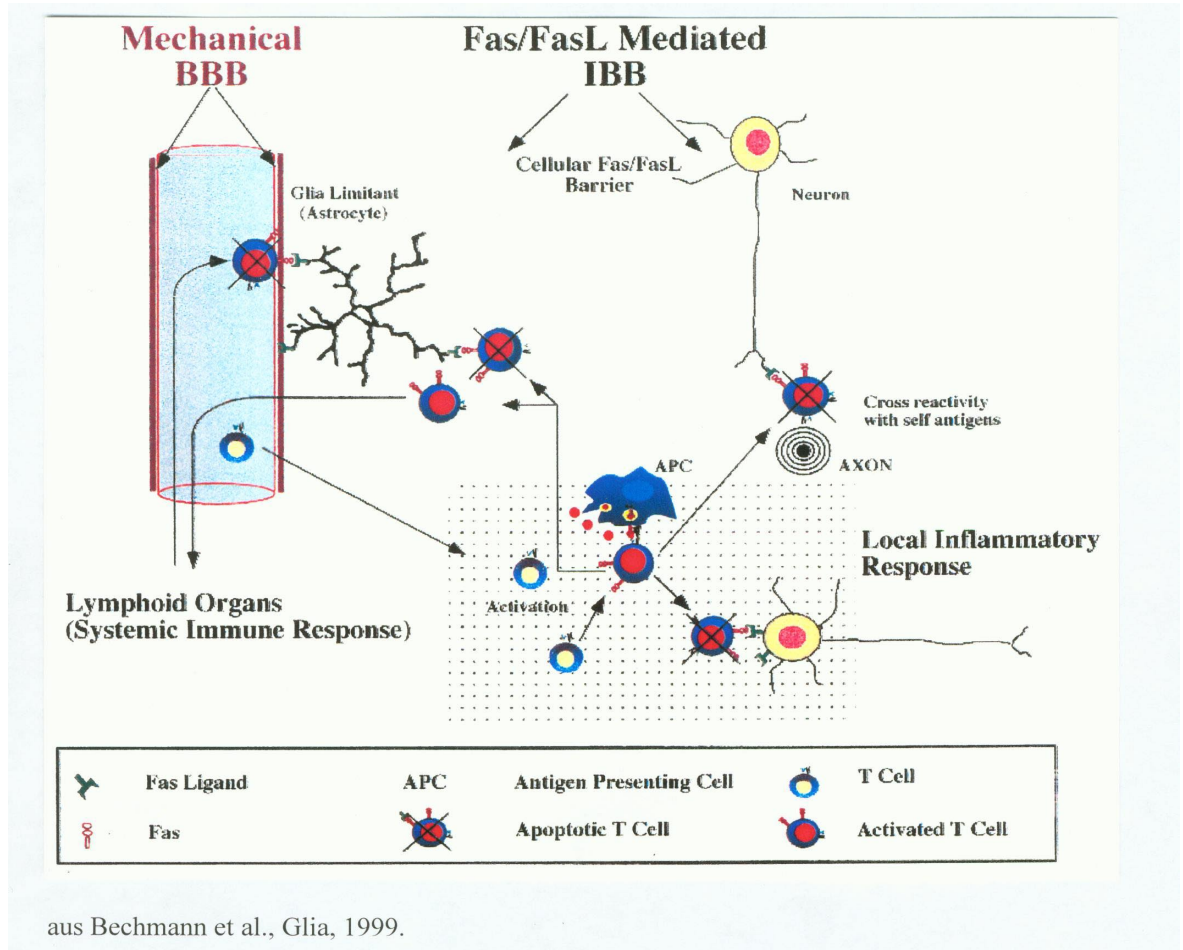


Abbildung 6:

Wie unter 2.2. gezeigt, stellt die Blut-Hirn-Schranke (BBB) keine Barriere für infiltrierende Leukozyten nach Läsion im ZNS dar. Einwanderende, voraktivierte und deshalb Fas-exprimierende T Zellen können jedoch schon an der Glia limitans durch FasL-positive Astrozyten ein Apoptose-Signal bekommen, womit eine **Immunologische Hirn-Schranke (IBB)** besteht. Antigen-spezifische Aktivierung durch lokale Antigenpräsentierende Zellen führt ebenfalls zur Hochregulation von Fas auf T Zellen, womit deren Empfänglichkeit für das FasL-Signal ansteigt. Schließlich können auch Neurone, durch deren FasL-Expression T Zell-Apoptose induzieren, was nun auch experimentell bestätigt wurde (Flügel et al. 2000).

Da auch Zellen des ZNS den CD95 Rezeptor exprimieren, kann CD95L Apoptose intrinsischer Zellen des Gehirns, z.B. von Oligodendrozyten induzieren (D'Souza et al. 1996) und spielt somit eine duale Rolle als Effektor- (Entfernen von T Zellen durch Zellen im Gehirn) und Target- (Schädigung von Zellen des Gehirns durch T Zellen) Mechanismus bei Entzündungen im ZNS (Sabelko-Downes et al. 1998). So entwickeln Fas- und FasL-defiziente Mäuse nur eine milde Form der EAE: Zwar werden durch das Fehlen von FasL im ZNS hochsignifikant weniger T Zellen durch die Induktion von Apoptose entfernt, durch den Ausfall des CD95/CD95L-Systems richten diese Zellen aber gleichzeitig geringeren Schaden an (Waldner et al. 1997; Sabelko et al. 1997). Mithilfe

von Maus-Chimären und DNA-Vaccination konnte die Bedeutung der Expression von CD95L auf Zellen des Gehirns für die Entfernung von T Zellen und damit der Termination inflammatorischer Prozesse jedoch mittlerweile eindeutig belegt werden (Sabelko-Downes et al. 1999, Wildbaum et al. 2000). Diese und ähnliche Befunde (Flügel et al. 2000) bestätigten unsere Auffassung der Expression von CD95L im ZNS als eine für die Aufrechterhaltung des Immunprivilegs wichtige Immunologische Hirschränke (IBB, Bechmann et al. 1999).

2.3.2 Das TRAIL System (Referenz 4)

Ähnlich wie CD95L ist TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) ein zur TNF-Familie gehörendes Protein, das über zwei Rezeptoren, TRAIL-R1 (Pan et al. 1997) und TRAIL-R2 (Sheridan et al. 1997, Walczak et al. 1997), Apoptose induziert. TRAIL-R3 (Sheridan et al. 1997; Degli-Esposti et al. 1997a, Pan et al. 1997) besitzt keine, TRAIL-R4 eine unvollständige intrazelluläre Todesdomäne. Daher werden TRAIL-R3 und R4 als sogenannte Decoy Rezeptoren angesehen, die durch ihre Bindung von TRAIL Apoptose inhibieren (Marsters et al. 1997, Pan et al. 1997, Degli-Esposti et al. 1997b).

Da wir weder TRAIL mRNA, noch TRAIL Protein im intakten ZNS finden konnten, scheint eine Rolle dieses Todesliganden bei der Regulation des Immunprivilegs im ZNS unwahrscheinlich (Dörr et al., eingereicht). Es ließen sich jedoch sowohl Apoptose-induzierende als auch Apoptose-blockierende Rezeptoren im humanen ZNS nachweisen (Abbildung 7), so daß wir die Rolle von TRAIL als Induktor von Apoptose intrinsischer Zellen des ZNS evaluiert haben.

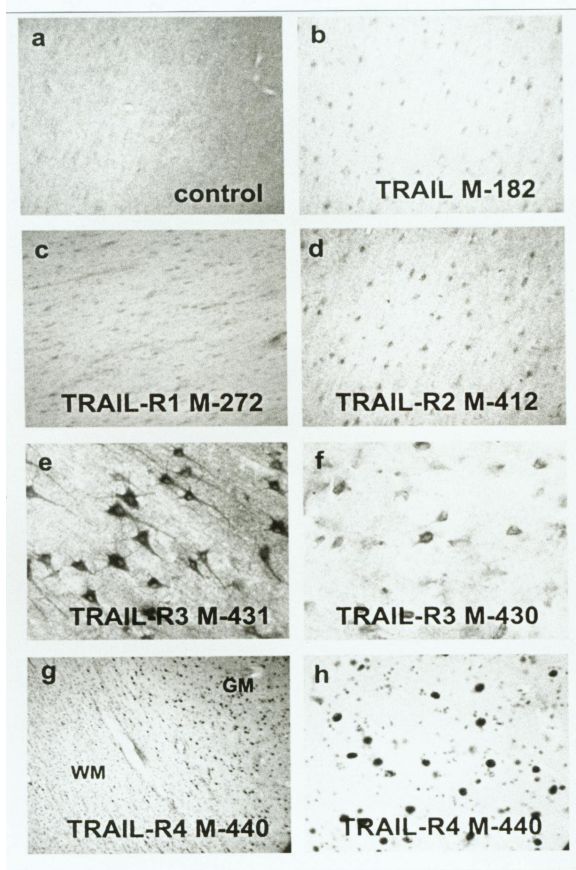


Abbildung 7:

Immunzytochemie für TRAIL und TRAIL Rezeptoren im humanen ZNS. Kontrolle (a), TRAIL (b) und TRAIL-R1 (c) ergeben keine eindeutige Färbung. TRAIL-R2 (d) scheint vorwiegend auf glialen Zellen, TRAIL-R3 (e, f) und TRAIL-R4 (g, h) auch auf Neuronen exprimiert zu sein.

Verwendet wurden monoklonale Mausantikörper der Firma Immumex (von Dr. H. Walczak, DKFZ Heidelberg)

Aufgrund methodischer Probleme konnte keine Doppelfluoreszenz-immunocytochemie zur Identifi-

kation der Zelltypen durchgeführt werden. Die funktionelle Charakterisierung erfolgte deshalb wie oben beschrieben (Nitsch et al. 2000, Referenz 4)

Dazu kultivierten wir akute humane Hirnschnitte von Epilepsie-Patienten, die wir dann mit TRAIL behandelten. Wir fanden, daß TRAIL Apoptose von Neuronen, Astrozyten, Mikrogliazellen und Oligodendrozyten induzieren kann. Da TRAIL von aktivierten, autoimmunen T Zellen exprimiert wird, kann dieser Todesligand ein wichtiges Kandidatenmoleküle bei Schadensmechanismen im entzündeten ZNS darstellen (Nitsch et al. 2000, Bechmann und Nitsch 2001). Da autoimmune T Zellen selbst nicht sensibel für TRAIL-induzierte Apoptose sind (Wendling et al. 2000), scheint TRAIL -im Gegensatz zum CD95-System- lediglich eine Rolle für Schädigung des entzündeten ZNS, nicht als Mechanismus des Immunprivilegs zu spielen. Daher kann die pharmakologische Blockade von TRAIL ein neuer Ansatz zum Schutz des ZNS während neuroinflammatorischer Erkrankungen sein (Nitsch et al. 2000; Dörr et al., eingereicht).

In Mäusen galt TRAIL als spezifischer Induktor von Apoptose in Tumorzellen (Roth et al. 1999; Walczak et al. 1999), weshalb klinische Versuche mit TRAIL zur Tumorthherapie vorgesehen waren. Erste Zweifel an der Spezifität von TRAIL für Tumorzellapoptose entstanden durch Befunde, die die Induktion von Apoptose normaler humaner Hepatozyten zeigten (Jo et al. 2000). Unsere Daten unterstreichen diese Befunde und erweitern sie in der Weise, daß offenbar auch Nicht-Tumor-Zellen des Gehirns sensibel für TRAIL induzierte Apoptose sind. Daher verbietet sich auch die Anwendung von TRAIL als lokal injiziertes Therapeutikum von Gliomen (Nitsch et al. 2000, **Referenz 4**).

2.4 Eine modifizierte Antigenpräsentation im ZNS nach axonaler Läsion

2.4.1 Immundeviation im Gehirn als Mechanismus von Immunprivileg

Die Interaktion zwischen einer Antigenpräsentierenden Zelle und einem T-Lymphozyten wird in ihrem Ergebnis von mehreren Faktoren beeinflusst (siehe S. 12). Die Art des Antigens, das lokale Zytokinmuster, sowie die differentielle Expression kostimulatorischer Moleküle sind entscheidend dafür, ob T Zell Anergie oder Aktivierung aus der Interaktion resultieren. Die Aktivierung selbst kann dabei in grundsätzlich verschiedene Richtungen, nämlich eine T-Helfer 1 oder T-Helfer 2 Antwort laufen. Zusätzlich können regulatorische T Zellen entstehen, die z.B. modulatorisch-suppressiv auf nachfolgende Aktivierung wirken können. In der vorderen Augenkammer wurde als erstem immunprivilegierten Organ beschrieben, daß die Injektion eines Antigens zwar eine systemische Immunantwort induziert, diese allerdings nicht einer Typ IV-Antwort, sondern einer Form von Toleranz entspricht (Kaplan und Streilein 1977). Ähnliches wurde in jüngster Zeit auch nach Antigenexposition im ZNS beschrieben (Wenkel et al. 2000; Brabb et al. 2000). Die zellulären Mitspieler sowie die molekularen Mechanismen dieser Induktion von Toleranz waren jedoch weitgehend unklar. Es war deshalb notwendig, zunächst diejenigen Zellen zu identifizieren, die zur Phagozytose und Präsentation von Antigenen im ZNS fähig sind, um dann deren Interaktion mit Zellen des spezifischen Immunsystems zu beschreiben. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls im Modell der entorhinalen Läsion durchgeführt und sind im folgenden beschrieben.

2.4.2 Identifikation phagozytierender Zellen nach entorhinaler Läsion (Referenzen 5-7)

Zur Identifikation phagozytierender Zellen wurde zunächst eine Methode Phagozytose-abhängiger Färbung etabliert, wie sie zuvor schon in Modellen retrograder Degeneration eingesetzt wurde. Die Methode beruht auf einer einfachen Idee: Neurone und ihre Fortsätze werden durch neuroanatomische Tracer markiert und nachfolgend geschädigt. Die Phagozytose des degenerierten, aber immer noch angefärbten Materials resultiert dann in einer Färbung der das Material aufnehmenden Zellen. Durch Gegenfärbung mittels Immunzytochemie oder Lektinbindung können nun die phagozytoseaktiven Zellen identifiziert werden. Eher zufällig entdeckten McBride et al. (1988) bei Studien zur Überlebenszeit afferenter Rückenmarksneuronen nach Durchtrennung der Hinterwurzel, daß die Abnahme der Anzahl markierter Neurone begleitet wurde von einer Zunahme angefärbter Gliazellen. Die Autoren schlossen daraus, daß diese Gliafärbung durch Inkorporation des gefärbten, degenerierten Materials hervorgerufen wurde. Rinaman et al. (1991)

identifizierten diese mit dem retrograden Tracer Fluoro-Gold gefüllten, nicht-neuronalen Zellen mittels Doppel-Fluoreszenzmikroskopie als Isolektin-B₄- positive Makrophagen und/oder Mikrogliazellen. Systematisiert und erweitert im Hinblick auf die verwendeten Tracer und den Einsatz von Elektronenmikroskopie wurde die Methode des Phagozytose-abhängigen Färbens aber erst von Thanos und Mitarbeitern. In einem Modell retrograder Degeneration untersuchte Thanos (1991, 1992; Thanos et al. 1994) retinale Glia nach Absterben vormarkierter Ganglienzellen. In seinen Experimenten verwendete Thanos neben Fluoro-Gold vor allem die Carbocyanine Dil (Grundform: 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindo-Carbocyanin Perchlorat) und 4-Di-10-Aspartat [N-4-(4-Didecylaminostyrol)-N-Methylpyridiniumiodid]. Diese Tracer haben den Vorteil einer sehr kräftigen und über Monate hinweg beständigen Fluoreszenz (Vidal-Sanz et al. 1988, Honig und Hume 1989; Thanos et al. 1993), so daß Zellen, die einmal phagozytiert haben, noch sehr lang identifizierbar bleiben. Die gefüllten Zellen identifizierte Thanos aufgrund morphologischer Kriterien als Mikrogliazellen. Damit wurden erstmals Untersuchung zur Chemotaxis amoeboider Mikroglia durch degenerierende Neurone in der Retina möglich (Thanos 1992). Weiterhin gelang der Nachweis, daß Mikrogliazellen aus der ruhenden Form mehrfach zu einer phagozytierenden Form aktiviert und anschließend wieder deaktiviert werden können (Thanos 1992). Nachdem Thanos die Verwendbarkeit von Carbocyaninen und Fluoro-Gold zur Untersuchung mikroglialer Phagozytose etabliert hatte, wurde sein Ansatz von einer Reihe anderer Arbeitsgruppen verwendet, um Phagozyten nach retrograder Degeneration im ZNS zu studieren. So haben Streit und Graeber (1993) und Angelov et al. (1995, 1996) ähnliche Experimente zur Identifikation von Neuron-phagozytierenden Zellen im Nucleus nervi facialis nach peripherer Läsion des VII. Hirnnerven durchgeführt. Sorensen und Mitarbeitern (1996) zeigten die Inkorporation Fluoro-Gold-markierter Neurone im Hypothalamus durch Mikroglia nach Aspiration des sensomotorische Cortex. Hollerbach und andere beschrieben Phagozytose von retrograd geschädigten Neuronen durch Mikroglia im Septum nach Fimbria-Fornix Transsektion (Hollerbach et al. 1998). Die Verwendung sowohl von Fluoro-Gold als auch von Carbocyaninen bringt jedoch einige methodische Schwierigkeiten mit sich. Von beiden ist bekannt, daß sie aus Zellen auslaufen und somit zu unspezifischer transzellulärer Anfärbung führen können (McBride 1988; Fritzsche und Wilm 1990). Von den hochlipophilen und daher membrangebundenen Carbocyaninen wurde berichtet, daß sie zumindest im fixierten Gewebe durch Kontakt von gefärbten Zellmembranen ins Plasmalemm benachbarter zellulärer Strukturen diffundieren können, so daß eine Phagozytose-unabhängige transzelluläre Anfärbung möglich ist (Kageyama und Robertson 1993). Fluoro-Gold wirkt darüber hinaus neurotoxisch (Illert et al. 1982), so daß die Verwendung für Experimente, die längere Überlebenszeiten der Tiere nach Injektion des Farbstoffes intendieren, problematisch ist. Ebenfalls von Nachteil ist, daß die Fluoreszenz sowohl von Fluoro-Gold als auch der Carbocyanine ein sehr weites Anregungs- und Emissionsspektrum besitzen, so daß die Identifikation der Phagozytose-abhängig gefärbten Zellen durch Gegenfärbung mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff erschwert ist. Daher wird die elektronenmikroskopische Untersuchung bei Verwendung dieser Tracer unerläßlich. Zum einen kann dabei auf morphologischer Grundlage deutlicher zwischen Astrozyten, Mikroglia und Neuronen unterschieden werden als es aufgrund der Morphologie in der Fluoreszenzmikroskopie möglich ist, zum anderen kann durch elektronendichte Konversion mittels DAB für Dil (von Bartheld 1990, Gansmüller et al. 1992, Lübke 1993) und durch Immunzytochemie für Fluoro-Gold (Chang 1990, Van-Bockstaele 1994) entschieden werden, ob der Tracer innerhalb von Phagosomen oder diffus an Membranen gebunden vorliegt (Thanos et al. 1994).

Für unsere Untersuchungen axonaler Degeneration mußte zunächst ein anterograde Tracer gefunden werden, der die entorhinal-hippocampale Projektion stabil für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen markiert. Dazu wurde das 10 kD schwere Biotin- und Rhodamin gekoppelte Dextranamin Mini Ruby (MR) verwendet. Mini Ruby ist nicht neurotoxisch (Gimlich und Braun 1985). Das an die Dextranamin-Ketten gekoppelte Rhodamin erzeugt unter Grünanregung eine starke und dauerhafte Fluoreszenz. Durch die gleichzeitige Biotinylierung ist eine DAB-Entwicklung und damit eine deutliche elektronendichte Konversion für ultrastrukturelle Untersuchungen möglich. Auf Grund seiner ausgeprägten Hydrophilie diffundiert MR im Gegensatz zu der Carbocyaninen nicht durch Membranen und läßt sich fixieren, so daß eine transzelluläre und damit unspezifische Anfärbung im nicht geschädigten Gewebe unwahrscheinlich ist (Fritzsche und Wilm 1990; Fritzsche 1993). Innerhalb der Zelle diffundiert es im Zytoplasma und führt so zu einer retrograden und anterograden Anfüllung auch feiner Zellfortsätze. Durch stereotaktische Applikation einiger Kristalle MR mit Hilfe einer speziell präparierten Spinalnadel in den medialen entorhinalen Cortex wurden die Axone des Tractus perforans angefärbt und durch nachfolgende stereotaktische entorhinale Läsion deren anterograde Degeneration induziert. In ihrem

Terminationsgebiet im Gyrus dentatus konnten dann zu verschiedenen Zeitpunkten nach entorhinaler Läsion MR-positive (also phagozytierende) Zellen durch Immunzytochemie und Lektinfärbung auf licht-, konfokal- und elektronenmikroskopischer Ebene identifiziert werden (Bechmann und Nitsch 1997a; **Referenz 5**; Köberts et al. 2000; **Referenz 6**). Die Etablierung einer im Prinzip gleichen Methode gelang uns auch im Modell der organotypischen Hirnschnittkultur (Kluge et al. 1998).

Mit Hilfe dieser Methode gelang uns der Nachweis, daß degeneriertes Myelin nach entorhinaler Läsion von Mikrogliazellen und Astrozyten phagozytiert wird. Phagozytische Mikrogliazellen waren schon am ersten Tag nach Läsion im Lichtmikroskop zu erkennen. Sie hatten die typische Morphologie amoeboider Mikroglia und ihre Umverteilung in die Zone anterograder Degeneration legte eine Invasion aus umliegenden Arealen nahe. Am Ende der ersten Woche zeigte die Mikroglia wieder die ramifizierte Morphologie "ruhender" Zellen. Phagozytische Astrozyten wurden im Lichtmikroskop um den Tag 6 nach Läsion sichtbar. In beiden Zelltypen fanden sich im Elektronenmikroskop mit Mini Ruby gefüllte myelinisierte Fasern (Bechmann und Nitsch 1997b; **Referenz 7**).

2.4.3 Identifikation Antigenpräsentierender Zellen nach entorhinaler Läsion (Referenz 8)

Da Astrozyten und Mikroglia als Myelin-phagozytierende Zellen identifiziert wurden, entstand die Frage, welche Zelltyp nachfolgend zur Antigenpräsentation fähig ist. Hierzu untersuchten wir die Expression von Adhäsionsmolekülen mit Hilfe Phagozytose-abhängiger Färbung nach entorhinaler Läsion. Solche Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie und der heterodimären Integrine sind unter anderem für die Bindung zwischen Antigenpräsentierenden Zellen und T Zellen und deren Kostimulation (siehe 2.4.5.) wichtig. Wir fanden, daß phagozytische Mikroglia, aber nicht Astrozyten die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, LFA-1 und VLA-4 exprimierten. Dieser Befund unterstützt zahlreiche in vitro-Daten, die nahelegen, daß Mikroglia, aber nicht Astrozyten effektive Antigenpräsentierende Zellen sind (etwa Aloisi et al. 1998; Übersichtsarbeit: Aloisi et al. 2000). Weiterhin zeigen unsere Ergebnisse, daß axonale Degeneration ein ausreichender Stimulus ist, die Expression der zur Antigenpräsentation wichtigen Adhäsionsmoleküle auf Mikroglia, nicht aber auf Astrozyten zu induzieren. (Hailer et al. 1997, **Referenz 8**).

2.4.4 Invasion von perivaskulären Zellen (Referenzen 9, 10)

Eine weitere Population von Zellen, die nach allgemeiner Auffassung an Antigenpräsentation im ZNS beteiligt ist (Graeber und Streit 1990; Hickey et al. 1992; Kösel et al. 1997; Angelov et al. 1998), sind die perivaskulären Makrophagen. Diese in den Virchow-Robin'schen Räumen gelegenen Zellen haben eine hohe phagozytische Kapazität (Mato et al. 1985; Bechmann und Nitsch 1997b, Bechmann et al. 2001) und exprimieren MHC-II Moleküle (Streit et al. 1989). Ihre strategisch wichtige Position zwischen Blut-Kompartiment und Parenchym des Gehirns (siehe Abbildung 8) suggeriert eine Rolle als wichtige Regulatorzellen bei der Induktion von Immunantworten (Übersichtsarbeit: Angelov et al. 1998).

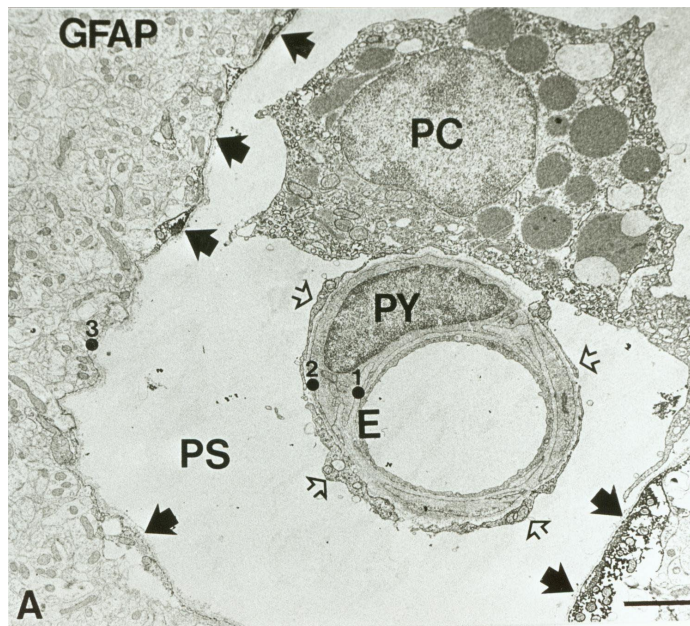


Abbildung 8:

Perivaskuläre Zelle (PC) liegen im perivaskulären Raum (PS) zwischen der zweiten, die Perizyten umgebenden, und der auf der Glia limitans gelegenen dritten Basalmembran. Die Glia limitans ist mit GFAP markiert (Pfeile). Eine erste Basalmembran ist um die Endothelzelle (E) zu erkennen. Die offenen Pfeile markieren Fortsätze des perivaskulären Makrophagen, die das Gefäß umgreifen.

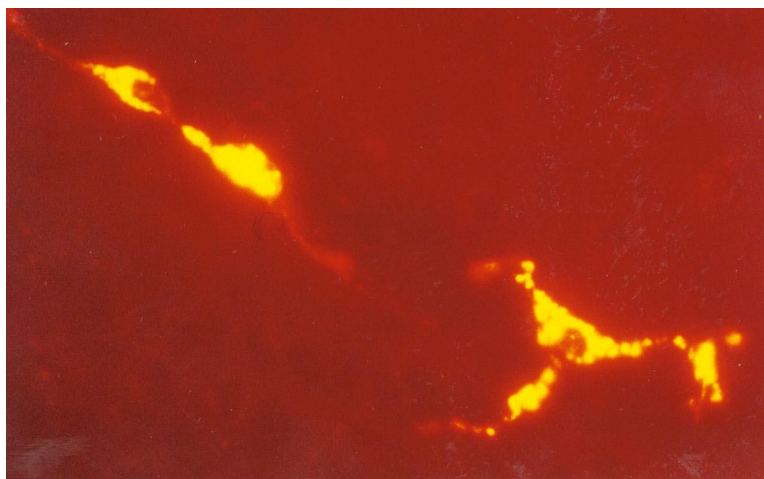


Abbildung 9:

Die hohe phagozytische Kapazität dieser Zellen wird deutlich nach Injektion hydrophiler Tracer, die entlang der perivaskulären Räume diffundieren. Der phagozytierte Farbstoff wird in deutlich sichtbaren Granula gespeichert, die den Phagosomen in Abbildung 5 entsprechen

Nach axonaler Läsion fand sich Myelin in den perivaskulären Makrophagen (Kösel et al. 1997), was die Frage nach deren Bedeutung als mögliche Antigenpräsentierende Zellen noch wichtiger macht. Da die perivaskulären Räume mit dem nicht immunprivilegierten subpialen/subarachnoidalen Liquorraum in Verbindung stehen, ist denkbar, daß perivaskuläre Zellen als Träger von Antigenen in der Peripherie agieren können. Dagegen spricht die Ansicht, daß es sich bei der Population der perivaskulären Makrophagen um residente Zellen handelt (Kida et al. 1993). Aus diesem Grund haben wir den Turnover dieser Zellpopulation im intakten ZNS untersucht.

Als erstes Paradigma verwendeten wir die unter 2.2. schon angesprochene GFP-transfizierte Maus-Chimäre (von Dr. med. J. Priller und Prof. Dr. med. U. Dirnagl., Neurologie der Charité).

Durch immunzytochemische Untersuchungen sowie durch Tracing-Studien evaluierten wir den Influx GFP-transfizierter Blutzellen in die perivaskulären Räume über die Zeit. Der Aufbau der Studie ist in Abbildung 10 erklärt:

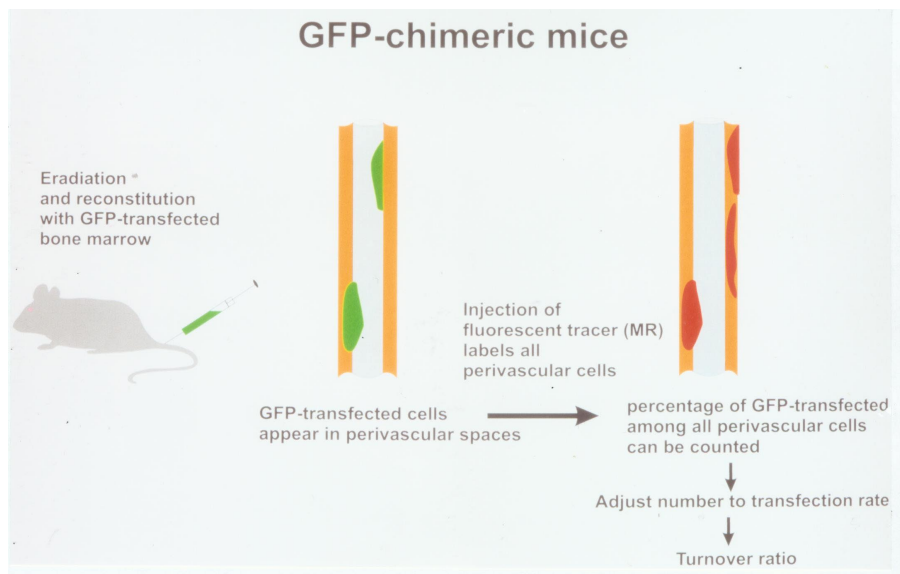


Abbildung 10:

Mäuse wurden bestrahlt und erhielten ein GFP-transfiziertes Knochenmarkstransplantat. Nach drei Monaten wurden alle perivaskulären Makrophagen durch Injektion von Mini Ruby markiert. Des Verhältnis aller perivaskulären zu GFP-positiven perivaskulären Makrophagen entspricht nach Angleichung an die Transfektionsrate dem Turnover (neu eingewanderte/alle perivaskuläre Makrophagen).

Wir fanden, daß nach drei Monaten zwischen 80 und 100% der perivaskulären Makrophagen aus dem Transplantat stammten. Damit war - zumindest für die Bedingungen einer Maus-Chimäre - die Behauptung von Kida et al. (1993) widerlegt, daß perivaskuläre Makrophagen resident sind (Bechmann et al., eingereicht; **Referenz 9**).

Um auszuschließen, daß der Turnover perivaskulärer Makrophagen durch die Bestrahlung oder die Knochenmarkstransplantation beeinflusst wurde, untersuchten wir die Einwanderung von Blutmakrophagen in die perivaskulären Räume in normalen, adulten Ratten mit zwei weiteren Methoden, die durch die folgenden Abbildungen 11 und 12 illustriert werden.

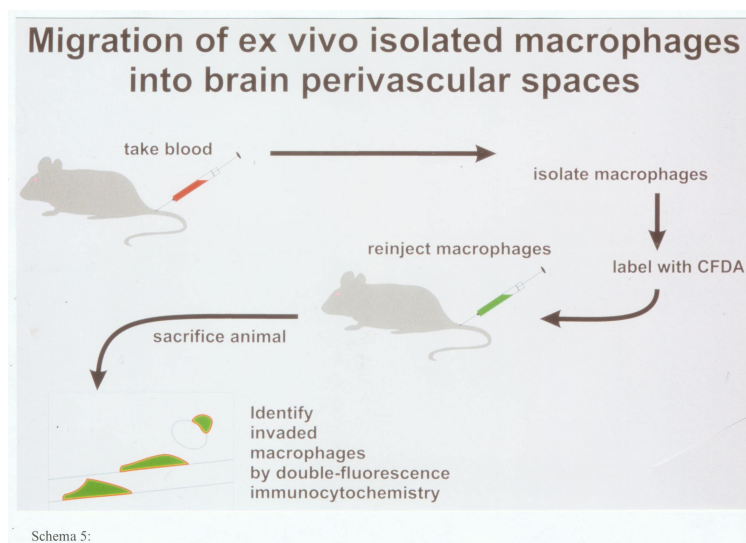


Abbildung 11:

Aus der Schwanzvene adulter Ratten wurde Blut entnommen und Makrophagen isoliert. Diese wurden dann mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und zurück in die Tiere gespritzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere dann getötet und die injizierten Makrophagen in den perivaskulären Räumen identifiziert. Mit Hilfe von Immunzytochemie wurde gezeigt, daß es sich bei den ex vivo isolierten und reinjizierten Zellen tatsächlich um Makrophagen handelte.

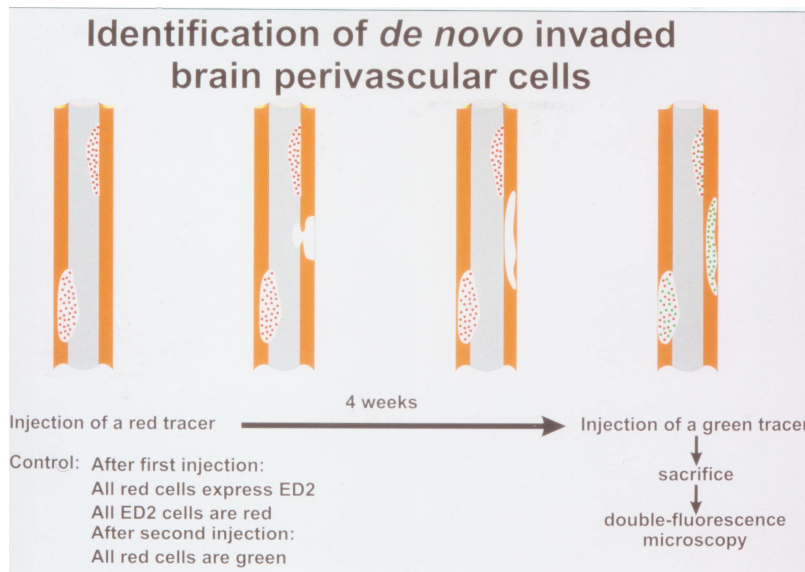


Abbildung 12:

Um eine quantitative Aussage über den Turnover zu machen, wurden die perivaskulären Makrophagen durch Injektion eines rot-fluoreszierenden Tracers in die Seitenventrikel markiert und vier Wochen später ein grün-fluoreszierender Tracer injiziert. Zellen die nach der ersten Injektion in die perivaskulären Räume eingewandert waren, färbten sich nur mit dem zweiten Tracer an. Das Verhältnis einfach-positiver zu doppel-positiven Zellen erlaubte die Kalkulation der Einwanderung. Mehrere Kontrollen validierten die Methode (siehe Referenz 10).

Wir fanden, daß innerhalb von vier Wochen etwa 6% der perivaskulären Zellen neu eingewandert waren. Dieses Ergebnis ist deutlich niedriger als das in den knochenmarkstransplantierten GFP-Mäusen beobachtete, zeigt aber ebenfalls, daß die Population der perivaskulären Makrophagen keineswegs resident ist. Damit wird deutlich, daß eine permanente Einwanderung in die perivaskulären Räume besteht, auch wenn noch unklar ist, ob die Makrophagen von dort aus die lymphatischen Organe erreichen. Dies wird gegenwärtig von uns untersucht.

Im Gegensatz zu Ergebnissen in Maus-Chimären (Kennedy und Abkowitz 1997), ergab sich in diesen Experimenten keinerlei Anhalt für die Transformation von Blutmakrophagen/ perivaskulären Makrophagen in Mikrogliazellen (Bechmann und Nitsch 1997b; Bechmann et al., im Druck, **Referenz 10**).

2.4.5 Differentielle Expression kostimulatorischer Moleküle nach axonaler Läsion als Mechanismus des Immunprivilegs (Referenz 11)

Die im vorangegangenen dargestellten Ergebnisse zeigten, daß nach entorhinaler Läsion Myelin von Astrozyten und Mikrogliazellen phagozytiert wird (Bechmann et al. 1997, **Referenz 7**). Mikrogliazellen entwickeln dann den Immunphänotyp Antigenpräsentierender Zellen. Da die Blut-Hirn-Schranke keine Barriere für einwandernde Leukozyten bildet (siehe 2.2.), stellte sich erneut die Frage, warum die Präsentation von Myelin auf lokalen Antigenpräsentierenden Zellen nicht zu destruktiven Immunantworten führt. Dies mag durch die lokale Expression von Todesliganden erklärt werden, die aktivierte Fas-empfindliche T-Zellen in den apoptotischen Zelltod treiben. In der Tat fanden wir solche apoptotischen Zellen in der Läsionszone (Bechmann et al. 1999, **Referenz 1**; Bechmann et al. 2000, **Referenz 2**). Dies scheint aber nicht der einzige hier greifende Mechanismus zu sein, da zum einen auch FasL-defiziente Mäuse nach entorhinaler Läsion keine Autoimmunerkrankung entwickeln (eigene unpublizierte Beobachtungen), zum anderen Brabb et al. (2000) und Wenkel et al. (2000) eine Immundeviation nach Antigenpräsentation im ZNS beschreiben. Diese Befunde legen nahe, daß eine Antigen-spezifische Interaktion im Gehirn

stattfindet, die allerdings keine destruktiven Immunantworten, sondern Toleranz induziert. Wie in Schema 1 (S.12) dargestellt, ist das Ergebnis Antigen-spezifischer Interaktion zwischen Antigenpräsentierenden Zellen und T Zellen abhängig von der Expression kostimulatorischer Moleküle. Neben ICAM-1 und LFA-1, deren Expression auf phagozytischer Mikroglia wir gezeigt haben (siehe 2.4.3., Hailer et al. 1997, **Referenz 8**), sind die B7-Moleküle hierbei von entscheidender Bedeutung. Dabei legen Blockade-Experimente im Modell der EAE nahe, daß Kostimulation über B7-1 destruktive, über B7-2 protektive Immunantworten induziert (Kuchroo et al. 1995; Racke et al. 1995; Miller et al. 1995; Gallon et al. 1997). In der Tat wurde B7-1 Expression auf Mikroglia im humanen Gewebe von MS Patienten gefunden (Windhagen et al. 1995; De Simone et al. 1995). Kuchroo et al. (1995) erklären die Effekte differentieller B7-Blockade durch die Induktion von gefährlichen T-Helfer 1 Antworten durch B7-1 und die Induktion protektiver T-Helfer 2 Antworten durch B7-2. Diese Befunde sind in Abbildung13 zusammengefaßt.

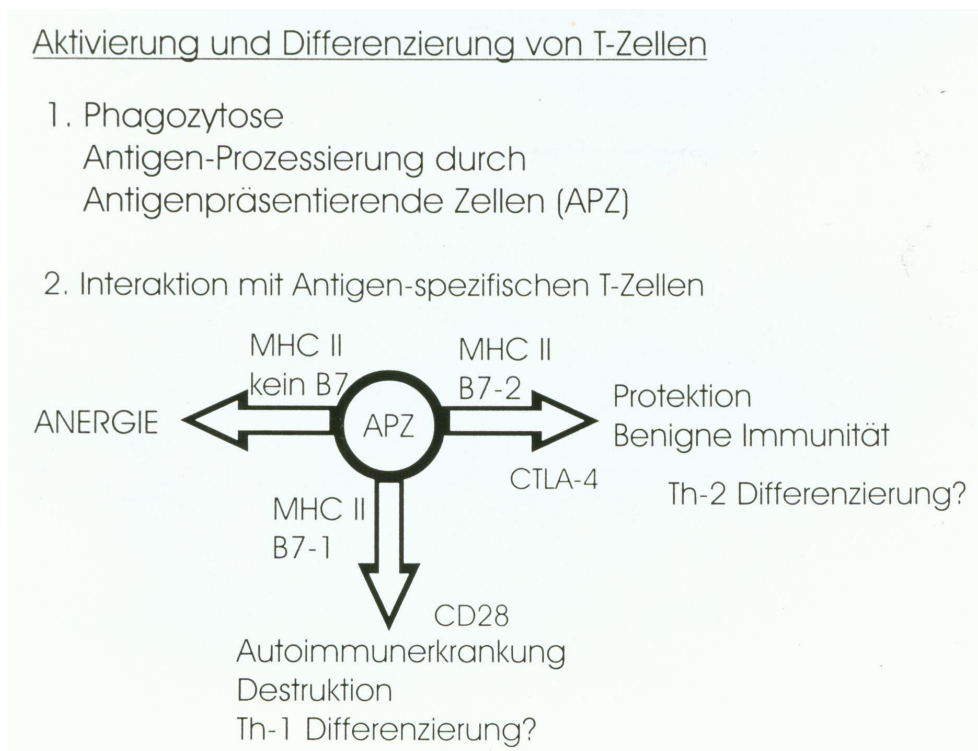


Abbildung 13:

Die Aktivierung des Spezifischen Immun-systems beruht auf zwei wichtigen Schritten, nämlich der Phagozytose und Prozessierung von Antigenen, sowie der Antigen-spezifischen Interaktion mit T Zellen über MHC-II Moleküle. Ohne kostimulatorische Moleküle induziert diese Interaktion T Zell-Anergie. Im Gehirn scheint unter Bedingungen der EAE, einer Interaktion mit B7-2 eher protektive, eine Interaktion über B7-1 destruktive Immun-antworten zu induzieren.

Um die Interaktion von T Zellen mit Myelin-phagozytischer Mikroglia nach entorhinaler Läsion im Hinblick auf das Ausbleiben von Immunreaktionen zu verstehen, haben wir die Invasion von T Zellen, die Expression von MHC-II, sowie die Expression von B7-1 und B7-2 Molekülen in diesem Modell untersucht. Wir fanden, daß es zur Invasion von T Zellen und zu deren Verbleib in Zonen retrograder Degeneration nach entorhinaler Läsion kam, während Mikrogliazellen auch Wochen nach entorhinaler Läsion noch MHC-II positiv waren. Damit sind die Bedingungen für eine Antigen-spezifische Interaktion zwischen Mikroglia und eingewanderten Lymphozyten möglich, die aber in Anbetracht der in Schema 7 zusammengefaßten Befunde eine protektiven Immunantwort induzieren sollte, da die Mikroglia nach Läsion zwar B7-2, nicht aber B7-1 exprimierten (siehe Abbildung 14).

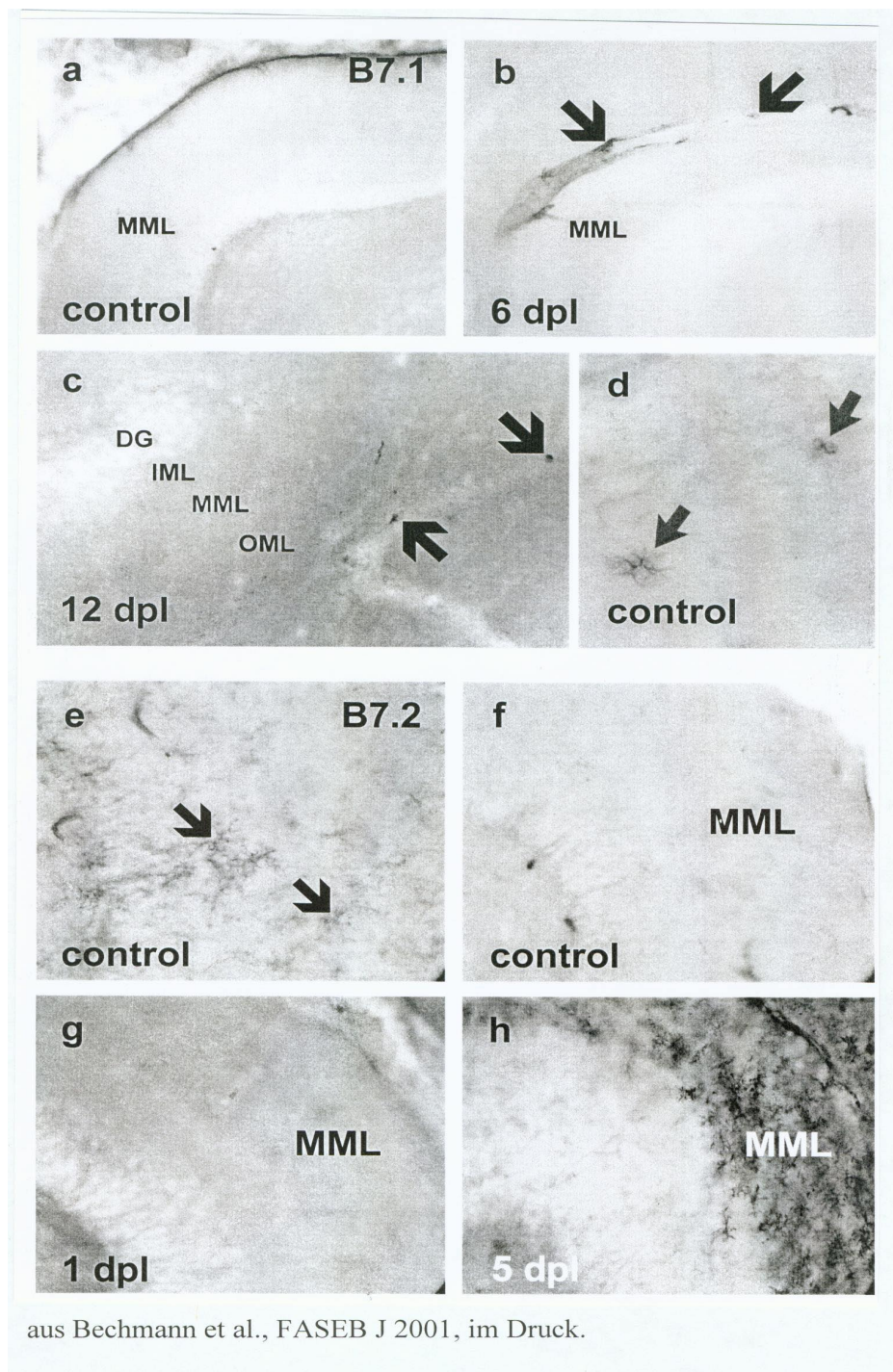


Abbildung 14:

(a-d) In Zonen anterograder Degeneration fand sich kein B7-1 in Kontrollen und nach Läsion (Pfeile zeigen auf positive perivaskuläre Zellen und einzelne Makrophagen und Mikroglia in anderen Bereichen des ZNS).

(e-f) Dagegen zeigten Mikrogliazellen eine geringe Ruheexpression sowie eine rasche Hochregulation von B7-2 nach Läsion in der Terminationszone des lädierten Tractus perforans, der mittleren Molekularschicht (MML).

Diese Befunde wurden von uns interpretiert als ein entscheidender Mechanismus des Immunprivilegs im ZNS nach axonaler Läsion. Mikrogliazellen präsentieren Myelin lokal nicht im Kontext von MHC-II mit B7-1, wodurch destruktive Immunantworten unterbleiben. Dagegen kann die Interaktion von B7-2 Toleranz oder sogar protektive Effekte induzieren. Dieser Gedanke wird unterstützt durch den Befund, daß sich in Zonen retrograder Degeneration, in denen Projektionen liegen, die an Wachstums- und Reorganisationsprozessen nach entorhinaler Läsion beteiligt sind,

sich auch Wochen nach Läsion noch T Zellen fanden, deren Anwesenheit aber keine Aktivierung von Mikrogliazellen induzierte. Diese T Zellen exprimierten ebenfalls B7-2, was eine negative Rückkopplung über den CTLA-4 Rezeptor erlaubt, die für eine Aktivierungsblockade verantwortlich sein könnte. (Bechmann et al., im Druck, **Referenz 11**). Diese Vorstellung wird zusammengefaßt in Abbildung 15:

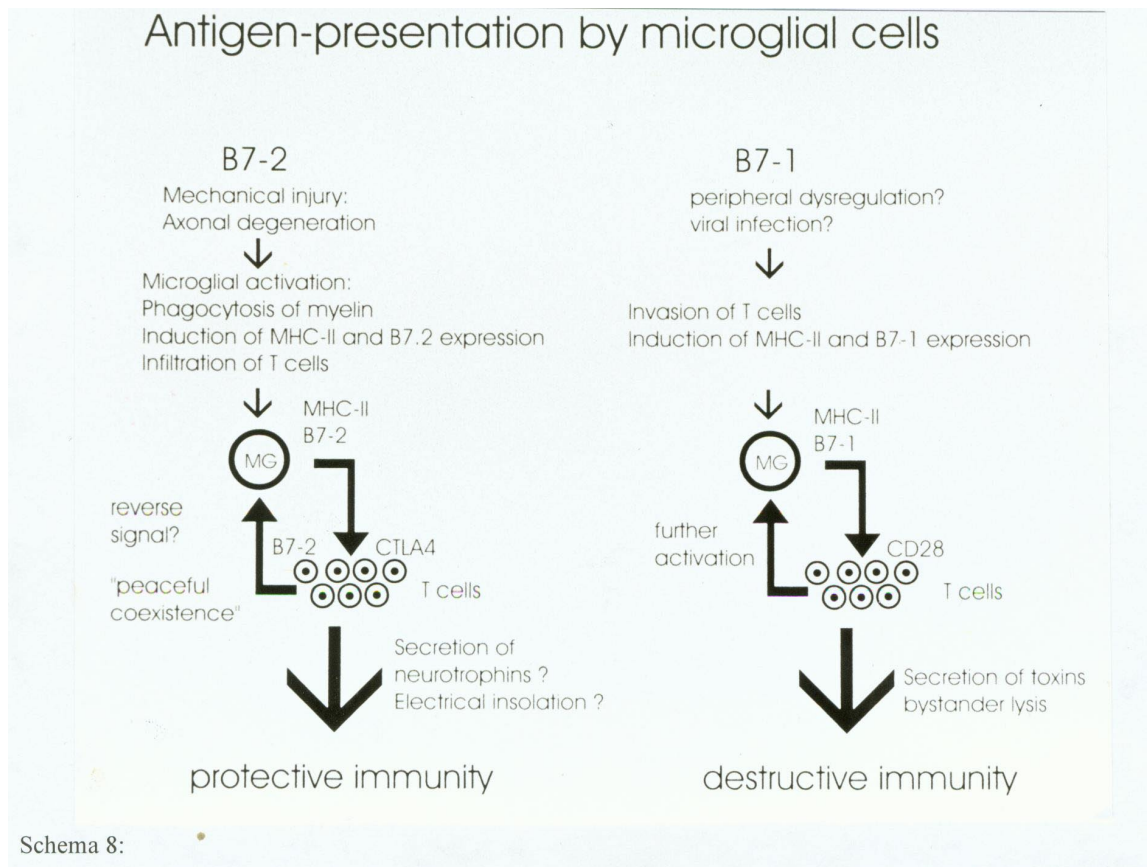


Abbildung 15: Mikrogliazellen präsentieren Antigene nach axonaler Degeneration über MHC-II im Kontext einer B7-2 Kostimulation, die nach gängiger Vorstellung neuroprotektive Antworten induziert. Durch gleichzeitig vorliegende Danger-Signale könnte eine B7-1 Expression auf Mikrogliazellen induziert und damit gefährliche Immunantworten induziert werden. So ließen sich kasuistisch auftretende Fälle von MS nach Trauma erklären (Goddin et al. 1999).

3 Zusammenfassung und Ausblick

Zentrale und periphere Mechanismen der Toleranz gegenüber Antigenen des ZNS sind inkomplett, was sich im physiologischen Vorhandensein autoreaktiver T Zellen zeigt, die gegen Antigene des Gehirns gerichtet sind (Schluesener und Wekerle 1985). Diese Zellen können nach peripherer Aktivierung expandieren und autoimmune Erkrankungen wie die Multiple Sklerose auslösen. Dies entspricht dem Konzept des Immunprivilegs im ZNS als einem Zustand von Toleranz gegenüber immunogenen, im Gehirn vorliegenden Antigenen, die nach peripherer Stimulation zusammenbrechen kann (Medawar 1948). Unklar war, warum mechanische Läsion nicht als Stimulus zu einem solchen Zusammenbruch der Toleranz gegenüber ZNS Antigenen führt (Goddin et al. 1999). In den hier zusammengefaßten Arbeiten wurden drei Hypothesen zur Erklärung dieses Phänomens untersucht:

1. Das Immunprivileg bleibt bestehen durch die mechanische Blut-Hirnschranke, die eine Infiltration von T Zellen inhibiert.
2. Durch die Expression von Todesliganden können aktivierte T Zellen aus dem Gehirn entfernt werden, wodurch eine Immunantwort supprimiert wird.
3. Eine besondere Form der Antigenpräsentation im Gehirn nach axonaler Läsion induziert Immundeprivation (Toleranz) anstatt einer T Zell-vermittelten destruktiven Immunantwort.

Während unsere Befunde die erste Hypothese widerlegen (**2.2. und 2.4.5., Referenz 11**), ergaben sich für die 2. und 3. Vorstellung klare Hinweise. Wir fanden, daß sowohl T Zellen, als auch Makrophagen nach entorhinaler Läsion ins ZNS migrieren. Makrophagen entwickeln dann die - wohl durch lokale Zytokinmuster induzierte- typische Morphologie von Mikroglia und sind mithin nicht von dieser zu unterscheiden. Zudem fanden wir, daß Blutmakrophagen permanent auch im intakten ZNS in die perivaskulären Räume einwandern, wo sie als Antigenpräsentierende Zellen fungieren können (**2.4.4., Referenz 9, 10**).

Im Hinblick auf die 2. Hypothese beschrieben wir die konstitutive Expression des Todesliganden CD95L auf Zellen des Gehirns, seine Hochregulation nach axonaler Läsion (**2.3.1., Referenz 1, 2**) und zeigten dann die Effizienz von Astrozyten über CD95 Apoptose von T Zellen zu induzieren (**Referenz 3**). Unser Befund, daß CD95L-defiziente Mäuse keine Autoimmunität nach entorhinaler Läsion entwickeln, schließt eine Rolle des CD95-Systems für die Aufrechterhaltung des Immunprivilegs nach axonaler Läsion nicht aus, da durch die Gendefizienz ein wichtiger Mechanismus T Zell-induzierter Gewebeschädigung vorliegen könnte (Sabelko-Downes 1999). Diese Frage ist nur mit Hilfe von Maus-Chimären zu klären, deren Immunzellen über intaktes CD95L-verfügen. Die Mittel für die Herstellung solcher Mäuse und zur Durchführung der Experimente sind von uns nun beantragt.

Eine Rolle für den Todesliganden TRAIL für die Aufrechterhaltung des Immunprivilegs erscheint nicht wahrscheinlich, da wir eine Expression von TRAIL im intakten ZNS nicht finden konnten (Dörr et al., eingereicht). Dagegen stellte sich TRAIL als potenter Induktor von Apoptose aller großen Zellpopulationen des ZNS heraus, was den vor unserer Publikation geplanten Einsatz von TRAIL zu Behandlung von Hirntumoren verbietet (**2.3.2., Referenz 4**).

Zur Klärung der 3. Hypothese beschrieben wir zunächst die zelluläre Immunbiologie axonaler Degeneration in vivo. Zur Identifikation phagozytischer Zellen entwickelten wir eine Methode Phagozytose-abhängiger Färbung im Verlauf anterograder Degeneration (**2.4.2., Referenz 5, 6**). Während Astrozyten und Mikrogliazellen an der Phagozytose degenerierenden Myelins beteiligt waren (**Referenz 7**), entwickelten im folgenden nur Mikrogliazellen den Immunphänotyp Antigenpräsentierender Zellen (**2.4.3., Referenz 8**). Myelin-phagozytierende, MHC-II-positive

Mikroglia zeigte dabei eine differentielle Expression kostimulatorischer Moleküle (B7-1⁻/B7-2⁺), die mit der Induktion neuroprotektiver Immunantworten in Zusammenhang gebracht werden kann **(2.4.5., Referenz 11)**. Inwieweit eine mechanische Schädigung des Gehirns in der Tat Toleranz gegenüber Myelin-Bestandteilen induziert, wird ebenso zu zeigen sein, wie die Frage, ob axonale Degeneration dann autoimmune Erkrankungen induziert, wenn gleichzeitig zur mechanischen Schädigung *Danger-Signale* vorliegen, die B7-1 Expression auf lokaler Glia induzieren. Entsprechende Untersuchungen werden derzeit von uns durchgeführt.

Zusammengenommen entsteht das Bild eines komplexen Zusammenwirkens verschiedener Mechanismen, die die delicate Balance der Toleranz gegenüber Antigenen des ZNS (Husbey und Goverman 2000) nach Läsion regulieren. Einige dieser Mechanismen, etwa die Expression von Todesliganden sind typisch für immunprivilegierte Organe (Bellgrau et al. 1995; Griffith et al. 1997), andere, wie die Induktion von Immundeviation lassen sich auch in anderen Geweben als Mechanismen peripherer Toleranz finden (Seddon und Mason 2000). Die (Dys-) Regulation solcher Prozesse aufzuklären, erscheint besonders wichtig und vielversprechend zu sein, da die Beeinflussung der Antigenpräsentation und Kostimulation und damit der Immunantwort als solcher pharmakologisch möglich zu sein scheint (z.B. Li et al. 1999, Schaub et al. 1999).

Es ist daher unsere Hoffnung, mit unseren hier vorgestellten Befunden und unseren zukünftigen Arbeiten zum Verständnis der Pathogenese von Autoimmunität, sowie zu deren Therapie beizutragen.

Literaturverzeichnis

4 zitierte Literatur

- Aloisi, F., Ria, F., Penna, G., Adorini, L. (1998) Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation: *J. Immunol.*; 160(10):4671-80
- Aloisi, F., Serafini, B., Adorini, L. (2000) Glia-T cell dialogue: *J Neuroimmunol.*; 107(2):111-7. 0165-5728
- Angelov, D.N., Gunkel, A., Stennert, E., Neiss, W.F. (1995) Phagocytic microglia during delayed neuronal loss in the facial nucleus of the rat, Time course of the neuronofugal migration of brain macrophages: *Glia*; 13:113-29
- Angelov, D.N., Neiss, W.F., Streppel, M., Walther, M., Guntinas-Lichius, O., Stennert, E. (1996) ED2-positive perivascular cells act as neuronophages during delayed neuronal loss in the facial nucleus of the rat: *Glia*; 16:129-39
- Angelov, D.N., Walther, M., Streppel, M., Guntinas-Lichius, O. & Neiss, W.F. (1998) The cerebral perivascular cells: *Adv. Anatom. Embryol.*, 147. 0301-5556
- Bechmann, I. und Nitsch, R. (1997a) Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: combination of axonal tracing and lectin or immunostaining: *Histochem. Cell Biol.*; 107:391-7
- Bechmann, I. und Nitsch, R. (1997b) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion. A light, confocal and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique: *Glia*; 20:145-54
- Bechmann, I., Mor, G., Nilsen, J., Eliza, M., Nitsch, R., Naftolin, C. (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain - Evidence for the existence of an Immunological Brain Barrier: *Glia*; 27: 62-74
- Bechmann, I. und Nitsch, R. (2000) Involvement of non-neuronal cells in entorhinal-hippocampal reorganization following lesions: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*; (911): 192-206
- Bechmann, I., Lossau, S., Steiner, B., Mor, G., Gimsa, U., Nitsch, R. (2000) Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and FasL (CD95L) expression, but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration: *Glia*; 32:25-41
- Bechmann, I., Peter, S., Beyer, M., Gimsa, U., Nitsch, R. (2001a) Presence of B-7.2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin-phagocytosing MHC-II positive rat microglia is associated with non-destructive immune response in vivo: *FASEB J.* (im Druck).
- Bechmann, I., Kwidzinski, K., Kovac, A.D., Simbürger, E., Horvath, T., Gimsa, U., Dirnagl, U., Priller, J., Nitsch, R. (2001b) Turnover of rat brain perivascular cells: *Exp Neurol.* (im Druck).
- Bechmann, I. und Nitsch, R. (2001) Plasticity following lesion: help and harm from the immune system: *Restor. Neurol. Neurosci.* (im Druck).
- Bechmann, I., Priller, J., Böntert, M., Wehner, T., Klett, F.F., Bohsung, J., Stuschke, M., Dirnagl, U., Nitsch, R. Immune surveillance of brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. (eingereicht)
- Bechmann, I., Steiner, B., Gimsa, U., Mor, G., Beyer, M., Zipp, F., Nitsch, F. (2000) astrocyte-induced T cells apoptosis is FasL-dependent. (eingereicht).
- Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A., Duke, R.C. (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection: *Nature*; 377(6550):630-2
- Brabb, T., von Dassow, P., Ordonez, N., Schnabel, B., Duke, B., Goverman, J. (2000) In situ tolerance within the central nervous system As a mechanism for preventing autoimmunity:

- J. Exp. Med.; 192(6):871-80.
- Chang, H.T., Kuo, H., Whittaker, J.A., Cooper, N.G. (1990) Light and electron microscopic analysis of projection neurons retrogradely labeled with Fluoro-Gold: notes on the application of antibodies to Fluoro-Gold: J. Neurosci. Methods.; 35(1): 31-7.
- Clusmann, H., Nitsch, R., Heinemann, U. (1994) Long lasting functional alterations in the rat dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a current source density analysis: Neuroscience; 61(4); 805-15.
- Cohen, I.R. und Schwartz, M. (1999) Autoimmune maintenance and neuroprotection of the central nervous system: J. Neuroimmunol.; 100(1-2):111-4.
- Cotman, C.W. und Nadler, J.V. (1978) Reactive synaptogenesis in the hippocampus: Neuronal plasticity (Herausgeber: Cotman, W.) New York: 227-71
- Cotman, C.W. und Nieto-Sampedro, M (1985) Progress in facilitating the recovery of function after central nervous system trauma: Hope for a new neurology (Herausgeber: Nottebohm, F.), Ann. N.Y. Acad. Sci.; 457: 83
- Cserr, H.F. und Knopf, P.M. (1992) Cervical lymphatica, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view: Immunology Today; 13(12):507-12
- De Simone, R., Giampaolo, A., Giometto, B., Gallo, P., Levi, G., Peschle, C., Aloisi, F. (1995) The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions: J. Neuropathol. Exp. Neurol. 54(2), 175-87
- Deadwyler, S.A., West, J.R., Cotman, C.W. (1975) Physiological studies of the reciprocal connections between the hippocampus and the entorhinal cortex: Exp. Neurol. 49:35-47
- Degli-Esposti, M.A., P.J. Smolak, H. Walczak, J. Waugh, C.-P. Huang, R.F. DuBose, R.G. Goodwin, Smith, C.A. (1997a). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family: J. Exp. Med.; 186:1165-70
- Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A., Goodwin, R.G. (1997b) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain: Immunity; 7(6):813-20
- Deller, T. (1998) The anatomical organization of the rat fascia dentata: New aspects of laminar organization as revealed by anterograde tracing with Phaseolus vulgaris- Leucoagglutinin (PHAL): Anat. Embryol.; 197:89-103
- Deller, T., Frotscher, M., Nitsch, R. (1995a) Phaseolus vulgaris -Leucoagglutinin (PHAL) tracing of commissural fibers to the rat dentate gyrus: evidence for a previously unknown commissural projection to the outer molecular layer: J. Comp. Neurol.; 352:55-68
- Deller, T., Frotscher, M., Nitsch, R. (1995b) Morphological evidence for the sprouting of inhibitory commissural fibers in response to the lesion of excitatory entorhinal input to the rat dentate gyrus: J. Neurosci.; 15(10): 6868-78
- Deller, T., Frotscher, M., Nitsch, R. (1996) Sprouting of crossed entorhinodentate fibers after unilateral entorhinal lesion: Anterograde tracing of fiber reorganization with Phaseolus vulgaris- Leucoagglutinin (PHAL): J. Comp. Neurol; 365:42-55
- Deller, T., Haas, C.A., Naumann, T., Joester, A., Faissner, A., Frotscher, M. (1997) Up-regulation of astrocyte derived tenascin-C correlates with neuritic outgrowth in the rat dentate gyrus after unilateral entorhinal lesion: Neuroscience; 81(3):829-46
- Diekmann, S., Ohm, T.G., Nitsch, R. (1996) Long-lasting transneuronal changes in rat dentate granule cell dendrites after entorhinal cortex lesion. A combined intracellular injection and electron microscopy study: Brain Pathol.; 6:205-15
- Dörr, J., Wendling, U., Grieger, U., Walczak, H., Krammer, P.H., Nitsch, R., Bechmann, I., Zipp, F. Expression and functional characterization of the TRAIL receptor/TRAIL system in human brain – implications for multiple sclerosis. (eingereicht)

- D'Souza, S.D., Bonetti, B., Balasingam, V., Cashman, N.R., Barker, P.A., Troutt, A.B., Raine, C.S., Antel, J.P. (1996) Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death: *J. Exp. Med.*; 184(6):2361-70
- Fagan, A.M. und Gage, F.H. (1990) Cholinergic sprouting in the hippocampus: a proposed role for IL-1: *Exp. Neurol.*; 110(1):105-20
- Flügel, A., Schwaiger, F.W., Neumann, H., Medana, I., Willem, M., Wekerle, H., Kreutzberg, G.W., Graeber, M.B. (2000) Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes: *Brain Pathol.*; 10(3):353-64
- Fritsch, B. (1993) Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines: *J. Neurosci. Methods*; 50:95-103
- Fritsch, B. und Wilm, C. (1990) Dextran amines in neuronal tracing: *Trends Neurosci.*; 13(1):14
- Frotscher, M., Heimrich, B., Deller, T. (1997) Sprouting in the hippocampus is layer-specific: *Trends Neurosci.*; 20(5): 218-22
- Gall, C., Rose, G., Lynch, G. (1979) Proliferative and migratory activity if glial cells in the partially deafferented hippocampus: *J. Comp. Neurol.*; 183:539-50
- Gallon, L., Chandraker, A., Issazadeh, S., Peach, R., Linsley, P.S., Turka, L.A., Sayegh, M.H., Khoury, S.J. (1997) Differential effects of B7-1 blockade in the rat experimental autoimmune encephalomyelitis model: *J. Immunol.*; 159(9), 4212-16
- Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. (1999) Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells: *Nat. Med.*; 5(11):1249-55
- Gansmüller, A., Kruger, F., Gumpel, M., Baron-Van Evercooren, A. (1992) Photoconverted carbocyanine Dil allows directly visualization of transplanted glial cells at the ultrastructural level: *Neurosci. Lett.*; 147:151-4
- Gehrmann, J., Schoen, S.W., Kreutzberg, G.W. (1991) Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the dentate gyrus: *Acta Neuropathol.*; 82:442-55
- Gimlich, R.L. und Braun, J. (1985) Improved fluorescent compounds for tracing cell lineage: *Dev. Biol.*; 109:509-14
- Gimsa, U., Peter, S., Bechmann, I., Nitsch, R. (2000) Invasion of organotypic tissue by activated T cells causes a functional activation of microglial cells and results in destruction of healthy axons: *Brain Pathol.*; 10(3):365-377
- Goddin, D.S., Ebers, G.C., Johnson, K.P., Rodriguez, M., Sibley, W.A., Wolinsky, J.S. (1999) The relationship of MS to physical trauma and psychological stress: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology: *Neurology.*; 52(9):1737-45
- Graeber, M.B. und Streit, W.J. (1990) Perivascular microglia defined: *Trends Neurosci.*; 13(9): 366
- Griffith, T.S. und Ferguson, T.A. (1997) The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege: *Immunol Today*; 18(5):240-4
- Hailer, P., Bechmann, I., Heizmann, S., Nitsch, R. (1997) Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons: *Hippocampus*; 7:341-9
- Hailer, N.P., Heppner, F.L., Haas, D., Nitsch, R. (1998) Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system: *Brain Pathol.*; 8(3):459-74
- Hauben, E., Butovsky, O., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., Mor, F., Leibowitz-Amit, R., Pevsner, E., Akselrod, S., Neeman, M., Cohen, I.R., Schwartz, M. (2000) Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion: *J Neurosci.*; 20(17):6421-30
- Hickey, W.F., Hsu, B.L., Kimura, H. (1991) T-Lymphocyte entry into the central nervous system: *J. Neurosci. Res.*; 28,254-60

- Hickey, W.F., Vass, K., Lassmann, H. (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 51(3): 246-256
- Hollerbach, E.H., Haas, C.A., Hildebrandt, H., Frotscher, M., Naumann, T. (1998) Region-specific activation of microglial cells in the rat septal complex following fimbria-fornix transection: *J. Comp. Neurol.*; 390(4): 481-96
- Honig, M.G. und Hume, R.I. (1989) Dil and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing: *Trends Neurosci.*; 12(9): 333-41
- Huseby, E.S., und Goverman, J. (2000) Tolerating the nervous system: A delicate balance: *J. Exp. Med.*; 191(5): 757-760
- Illert, M., Fritz, N., Aschoff, A., Hollander, H. (1982) Fluorescent compounds as retrograde tracers compared with horseradish peroxidase (HRP). II. A parametric study in the peripheral motor system of the cat: *J. Neurosci. Methods*; 6(3): 199-218
- Issazadeh, S., Navikas, V., Schaub, M., Sayegh, M., Khoury, S. (1998) Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo: *J. Immunol.*; 161(3): 1104-12
- Jensen, M.B., Gonzalez, B., Castellano, B., Zimmer, J. (1994) Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration: a histochemical and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesion: *Exp. Brain Res.*; 98:245-60
- Jo, M., Kim, T.H., Seol, D.W., Esplen, J.E., Dorko, K., Billiar, T.R., Strom, S.C. (2000) Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: *Nat Med.*; 6(5):564-7.
- Kageyama, G.H. und Robertson, R.T. (1993) Transcellular retrograde labeling of radial glial cells with WGA-HRP and Dil in neonatal rat and hamster: *Glia.*; 9(1): 70-81
- Kaplan, H.J. und Streilein, J.W. (1977) Immune response to immunization via the anterior chamber of the eye. I. F. lymphocyte-induced immune deviation: *J. Immunol.*; 118(3):809-14
- Kennedy, D.W. und Abkowitz, J.L. (1997) Kinetics of the Central Nervous System Microglial and Macrophage engraftment: Analysis using a transgenic bone marrow transplantation model: *Blood*; 90(3): 986-993
- Kida, S., Steart, P.V., Zhang, E.T., Weller, R.O. (1993) Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages: *Acta Neuropathol. Berl.*; 85(6): 646-52
- Kluge, A., Hailer, N.P., Horvath, T.L., Bechmann, I., Nitsch, R. (1998) Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway in vitro: *Hippocampus*; 8: 57-68
- Köbberts, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J.L., Mey, J., Thanos, S. (2000) Current concepts of neuroanatomical tracing: *Prog. Neurobiol.*; 62(4): 327-351
- Kösel, S., Egensperger, R., Bise, K., Arbogast, S., Mehraein, P., Graeber, M.B. (1997) Long-lasting perivascular accumulation of major histocompatibility complex class II-positive lipophages in the spinal cord of stroke patients: possible relevance for the immune privilege of the brain: *Acta Neuropathol. Berl.*; 94(6): 532-8
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N., Glimcher, L.H. (1995) B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy: *Cell*; 80(5): 707-18
- Li, Y., Li, X.C., Zheng, X.X., Wells, A.D., Turka, L.A., Strom, T.B. (1999) Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance: *Nat. Med.*; 5(11):1298-302

- Loesche, J. und Steward, O. (1977) Behavioral correlates of the denervation and reinnervation of the hippocampal formation of the rat: recovery of alteration performance following unilateral entorhinal lesion: *Brain Res. Bull.* 2:31-9
- Lübke, J. (1993) Photoconversion of diaminobenzidine with different Fluorescent markers into a light and electron microscopic dense reaction product: *Microsc. Res. Techn.*; 24:2-14
- Lynch, G., Deadwyler, S.A., Cotman, G. (1973) Postlesion axonal growth produces permanent functional connections: *Science*; 180:1364-8
- Lynch, G., Matthews, D.A., Mosko, S., Parks, T., Cotman, W. (1972) Induced acetylcholine-rich layer in rat dentate gyrus following entorhinal lesion: *Brain Res.*; 42:311-8
- Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A.D., Godowski, P. Ashkenazi, A. (1997) A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain: *Curr.Biol.*; 7:1003-6
- Mato, M., Ookawara, S., Mato, T.K., Namiki, T. (1985) An attempt to differentiate further between microglia and fluorescent granular perithelial (FGP) cells by their capacity to incorporate exogenous protein: *Am. J. Anat.*; 172: 125-140
- Matthews, D.A., Cotmann C.W., Lynch, G. (1976a) An electron microscopical study of lesion induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I Magnitude and time course of degeneration: *Brain Res.*; 115: 1-21
- Matthews, D.A., Cotmann, C.W., Lynch, G. (1976b) An electron microscopical study of lesion induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. II. Reappearance of morphologically normal synaptic contacts: *Brain Res.*; 115:23-41
- Matzinger, P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.*; 12:991-1045
- Matzinger, P. (1998) An innate sense of danger. *Semin: Immunol.*; 10(5):399-415
- McBride, R.I., Feringa, E.R., Smith, B.E. (1988) The fate of prelabeled Clarke's column neurons after axotomy: *Exp. Neurol.*; 102(2):236-43
- Medawar, P.B. (1948) Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye: *British J. Exp. Pathol.*; 29: 58-69
- Miehe, U., Leranath, C., Ohm, T.G., Nitsch, R. (1994) Long-lasting transneuronal dendritic changes of GABAergic neurons in the monkey dentate gyrus following entorhinal lesion: *Neurosci. Lett.*; 168:115-8
- Miller, S.D., Vanderlugt, C.L., Lenschow, D.J., Pope, J.G., Karandikar, N.J., Dal Canto, M.C., Bluestone, J.A. (1995) Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE: *Immunity*; 3(6):739-45
- Miyawaki, T., Uehara, T., Nibu, R., Tsuji, T., Yachie, A., Yonehara, S., Taniguchi, N. (1992) Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood: *J. Immunol.*; 149(11):3753-8
- Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I.R., Schwartz, M. (2000) Production of Neurotrophins by Activated T Cells: Implications for Neuroprotective Autoimmunity: *J Autoimmun.*; 15(3):331-45
- Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I.R., Schwartz, M. (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.*; 5(1):49-55
- Mor, G., Nelson, J., Horvath, T., Bechmann, I., Brown, S., Garcia-Segura, L., Naftolin, F. (1999) Estrogen and microglia: a regulatory system that affects the brain: *J. Neurobiol.*; 40(4): 484-96

- Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A., Mellor, A.L. (1999) Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism: *J. Exp. Med.*; 189(9):1363-72
- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C. (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism: *Science*; 281(5380):1191-3
- Myhrer, T. (1975) Maze performance in rats with hippocampal perforant path lesion: some aspects of functional recovery: *Physiol. Behav.*; 15:433-7
- Nagata, S. und Suda, T. (1995) Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations: *Immunology Today*; 16: 39-43
- Nitsch, R. und Frotscher, M. (1991) Maintenance of peripheral dendrites of GABAergic neurons requires specific input: *Brain Res.*; 554:304-7
- Nitsch, R. (1993) Transneuronal changes in lesion-induced entorhinal-hippocampal system: *Hippocampus*; 3: 247-56
- Nitsch, R. und Frotscher, M. (1993) Transneuronal changes in the dendrites of GABAergic parvalbumin-containing neurons of the rat fascia dentata following entorhinal lesion: *Hippocampus*; 3(4):481-90
- Nitsch, R. und Leranth, C. (1994) Sprouting of remaining substance P-immunoreactive fibers in the monkey dentate gyrus following denervation from its substance P-containing hypothalamic afferents: *Exp. Brain Res.*; 100:522-6
- Nitsch, R., Bechmann, I., Deisz, R.A., Haas, D., Lehmann, T.N., Wendling, U., Zipp, F. (2000) Cell death induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in adult human brain tissue *Lancet*; 356: 827-828
- O'Connell, J., Bennett, M.W., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., Shanahan, F. (1997) The Fas counterattack: a molecular mechanism of tumor immune privilege: *Mol Med.*; 3(5):294-300
- Owen-Schaub, L.B., Yonehara, S., Crump, W.L. 3d, Grimm, E.A. (1992) DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement: *Cell. Immunol.*; 140(1):197-205
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y., Yu, G., Gentz, R., Dixit, V.M. (1997) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL: *Science*; 277:815
- Racke, M.K., Scott, D.E., Quigley, L., Gray, G.S., Abe, R., June, C.H., Perrin, P.J. (1995) Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis: *J. Clin. Invest.*; 96(5): 2195-2203
- Raisman, G. (1969) Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat: *Brain Res.*; 89:25-45
- Restifo, N.P. (2000) Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape: *Nat Med.*; 6(5):493-5
- Rinaman, L., Milligan, C.E., Levitt, P. (1991) Persistence of fluoro-gold following degeneration of labeled motoneurons is due to phagocytosis by microglia and macrophages: *Neuroscience*; 44(3):765-76
- Roth, W., Isenmann, S., Naumann, U., Kugler, S., Bahr, M., Dichgans, J., Ashkenazi, A., Weller, M. (1999) Locoregional Apo2L/TRAIL eradicates intracranial human malignant glioma xenografts in athymic mice in the absence of neurotoxicity: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 265(2):479-83
- Sabelko, K. A., Kelly, K.A., Nahm, M.H., Cross, A.H., Russell, H. (1997), Fas and fas ligand enhance the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis, but are not essential for immune privilege in the central nervous system: *J. Immunol.*; 159: 3096-99
- Sabelko-Downes, K.A., Cross, A.H., Russell, J.H. (1999) Dual role for Fas ligand in the initiation of and recovery from experimental allergic encephalomyelitis: *J. Exp. Med.*; 189(8):1195-205

- Schaub, M., Issazadeh, S., Stadlbauer, T.H., Peach, R., Sayegh, M.H., Khoury, S.J. (1999) Costimulatory signal blockade in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis: *J. Neuroimmunol.*; 96(2):158-66
- Schluesener, H.J. und Wekerle, H. (1985) Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations: *J. Immunol.*; 135(5):3128-33
- Schwartz, M., Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Cohen, I.R. (1999) Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair: *Trends Neurosci.*; 22(7):295-9
- Seddon, B. und Mason, D. (2000) Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity: *J. Exp. Med.*; 189(5):877-81
- Serpe, C.J., Sanders, V.M., Jones, K.J. (2000) Kinetics of facial motoneuron loss following facial nerve transection in severe combined immunodeficient mice: *J. Neurosci. Res.*; 62(2):273-8
- Sheridan, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A.D., Godowski, P., Ashkenazi, A. (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors: *Science*; 277:818
- Shirai, Y. (1921) On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals: *Jpn. Med. World*; 1(14), 15
- Steward, O. und Messenheimer, J.A. (1978) Histochemical evidence for a postlesion reorganization of cholinergic afferents in the hippocampal formation of the mature cat: *J. Comp. Neurol.*; 214:370-86
- Steward, O. und Vinsant, S.L. (1983) The process of reinnervation in the dentate gyrus of the adult rat: a quantitative and electron microscopic analysis of terminal proliferation and reactive synaptogenesis: *J. Comp. Neurol.*; 214:370-86
- Steward, O., Loesche, J., Horton, W.C. (1977) Behavioral correlates of denervation and reinnervation of the hippocampal formation of the rat: open field activity and cueutilization following bilateral entorhinal cortex lesions: *Brain Res. Bull.*; 2:41-8
- Steward, O., White, C.W., Cotman, C.W., Lynch, G. (1976) Potentiation of excitatory synaptic transmission in the normal and in the reinnervated dentate gyrus of the rat: *Exp. Brain Res.*; 26:423-41
- Streilein, J.W. und Niederkorn, J.Y. (1985) Characterization of the suppressor cell(s) responsible for anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) induced in BALB/c mice by P815 cells: *J. Immunol.*; 134(3):1381-7
- Streilein JW. (1996) Peripheral tolerance induction: lessons from immune privileged sites and tissues: *Transplant Proc.*; 28(4):2066-70
- Streilein, J.W. (1995) Unraveling immune privilege: *Science*; 270: 1158-9
- Streit, W.J. und Graeber, M.B. (1993) Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm: *Glia*; 7(1):68-74
- Streit, W.J., Graeber, M.B. & Kreutzberg, G.W. (1989) Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury: *Exp. Neurol.*; 105(2): 115-26
- Thanos, S. (1991) Specific transcellular carbocyanine-labelling of rat retinal microglia during injury-induced neuronal degeneration: *Neurosci. Lett.*; 127(1):108-12
- Thanos, S. (1992) Sick photoreceptors attract activated microglia from the ganglion cell layer: a model to study the inflammatory cascades in rats with inherited retinal dystrophy: *Brain Res.*; 588:21-8
- Thanos, S, Mey, J., Wild, M. (1993) Treatment of adult retina with microglia-suppressing factor retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro: *J. Neurosci.*; 13(2): 455-66

- Thanos, S., Kasca, J., Seeger, J., Mey, J. (1994) Old dyes for new scopes: phagocytosis-dependent long-term fluorescence labelling of microglial cells in vivo: *Trends Neurosci.*; 17(5):177-82
- Van Bockstaele, E.J., Wright, A.M., Cestari, D.M., Pickel, V.M. (1994) Immunolabeling of retrogradely transported Fluoro-Gold: sensitivity and application to ultrastructural analysis of transmitter-specific mesolimbic circuitry: *J. Neurosci. Methods*; 55(1): 65-78
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., Bray, G.M., Aguayo, A.J. (1988) Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye Dil: *Exp. Neurol.*; 92-101
- Von Bartheld, C.S., Cunningham, D.E., Rubel, E.W. (1990) Neuronal tracing with Dil: Decalcification, Cryosectioning, and Photoconversion for light and electron microscopy: *J. Histochem. Cytochem.*; 38(5):725-33
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., Schuh, J.C., Lynch, D.H (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo: *Nat Med.*; 5(2):157-63
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R., Rauch, C.T. (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL: *EMBO J.*; 16:5386-97
- Waldner, H., Sobel, R., Howard, E., Kuchroo, V. (1997) Fas- and FasL-Deficient Mice Are Resistant to Induction of Autoimmune Encephalomyelitis: *J. Immunol.*; 159: 3100-3
- Wekerle, H. (1993) Lymphocyte traffic to the brain., In: *The Blood-Brain Barrier*, (W. M. Pardridge, ed., New York, Raven Press, 67-85
- Wendling, U., Walczak, H., Dorr, J., Jaboci, C., Weller, M., Krammer, P.H., Zipp, F. (2000) Expression of TRAIL receptors in human autoreactive and foreign antigen-specific T cells: *Cell Death Differ.*; 7(7):637-44
- Wenkel, H., Streilein, J.W., Young, M.J. (2000) Systemic immune deviation in the brain that does not depend on the integrity of the blood-brain barrier: *J Immunol.*; 164(10):5125-31
- Wildbaum, G., Westermann, J., Maor, G., Karin, N. (2000) A targeted DNA vaccine encoding fas ligand defines its dual role in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: *J. Clin. Invest.*; 106(5):671-9
- Windhagen, A., Newcombe, J., Dangond, F., Strand, C., Woodroffe, M.N., Cuzner, M.L., Hafler, D.A. (1995) Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions: *J. Exp. Med.*; 182(6): 1985-1996
- Zimmer, J. (1976) Extended commissural and ipsilateral projections in postnatally deentorhinated hippocampus and fascia dentata demonstrated in rats by silver impregnation: *Brain Res.*; 64:293-311

4.1 Publikationsliste

1. Bechmann, I. and Nitsch, R. (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion. A light, confocal and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique: *Glia* 20:145-154. (IF 3,67)
2. Bechmann, I. and Nitsch, R. (1997) Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: combination of axonal tracing and lectin or immunostaining: *Histochem. Cell Biol.* 107:391-7. (IF 1,687)
3. Hailer, P., Bechmann, I., Heizmann, S., Nitsch, R. (1997) Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons:

Hippocampus 7:341-9. (IF 4,00)

4. Horvath, T., Bechmann, I., Naftolin, F., Kalra, S., Leranth, C. (1997) Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations: *Brain Res.* 756:283-6. (IF 2,150)
5. Bergmann, M., Post, A., Rittel, I., Bechmann, I., Nitsch, R. (1997) Expression of synaptophysin in sprouting neurons after entorhinal lesion in the rat: *Exp. Brain Res.* 117:80-6. (IF 2,018)
6. Kluge, A., Hailer, N.P., Horvath, T.L., Bechmann, I., Nitsch, R. (1998) Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway in vitro: *Hippocampus* 8: 57-68. (IF 4,00)
7. Bechmann, I., Mor, G., Nilsen, J., Eliza, M., Nitsch, R., Naftolin, C. (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain - Evidence for the existence of an Immunological Brain Barrier: *Glia* 27: 62-74. (IF 4,245)
8. Mor, G., Nelson, J., Horvath, T., Bechmann, I., Brown, S., Garcia-Segura, L., Naftolin, F. (1999) Estrogen and microglia: a regulatory system that affects the brain: *J. Neurobiol.* 40(4): 484-96.(IF 3,330)
9. Bechmann, I. and Nitsch, R. (2000) Involvement of non-neuronal cells in entorhinal-hippocampal reorganization following lesions: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (911): 192-206. (IF 0,959)
10. Köbber, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J.L., Mey, J., Thanos, S. (2000) Current concepts of neuroanatomical tracing: *Prog. Neurobiol.* 62(4): 327-351. (IF 7,090)
11. Gimsa, U., Peter, S., Bechmann, I., Nitsch, R., (2000) Invasion of organotypic tissue by activated T cells causes a functional activation of microglial cells and results in destruction of healthy axons: *Brain Pathol.* 10(3):365-377. (IF 4,154)
12. Bechmann, I., Lossau, S., Steiner, B., Mor, G., Gimsa, U., Nitsch, R. (2000) Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and FasL (CD95L) expression, but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration: *Glia* 32:25-41. (IF 4,245)
13. Nitsch, R. , Bechmann, I.*, Deisz, R.A., Haas, D., Lehmann, T.N., Wendling, U., Zipp, F. (2000) Cell death induced by tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in adult human brain tissue: *Lancet* 356: 827-828. (IF 11,793)
* equally contributing first author
14. Diano, S., Urbanski, H.F., Horvath, B., Bechmann, I., Kagiya, A., Nemeth, G., Naftolin, F., Warden, C.H., Horvath, T.L. (2000) Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) expression in non-human primate brain and pituitary gland: *Endocrinology* 141: 4226-4238. (IF 4,633)
15. Bechmann, I. and Nitsch, R. (2001) Plasticity following lesion: help and harm from the immune system: *Restor. Neurol. Neurosci.* (im Druck). (IF 1,196)
16. Bechmann, I., Peter, S., Beyer, M., Gimsa, U., Nitsch, R. (2001) Presence of B-7.2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin-phagocytosing MHC-II positive rat microglia is associated with non-destructive immune response in vivo: *FASEB J.* (im Druck). (IF 13,861)
17. Bechmann, I., Kwidzinski, K., Kovac, A.D., Simbürger, E., Horvath, T., Gimsa, U., Dirnagl, U., Priller, J., Nitsch, R. (2001) Turnover of rat brain perivascular cells: *Exp Neurol.* (im Druck) (IF 2,863)

Summe der Impact Factor-Punkte: 75,895.

4.2 Referenzen: Ausgewählte Publikationen und Manuskripte

1. Bechmann, I., Mor, G., Nilsen, J., Eliza, M., Nitsch, R., Naftolin, C. (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain - Evidence for the existence of an Immunological Brain Barrier: *Glia* 27: 62-74. (IF 4,245)
2. Bechmann, I., Lossau, S., Steiner, B., Mor, G., Gimsa, U., Nitsch, R. (2000) Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and FasL (CD95L) expression, but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration: *Glia* 32:25-41. (IF 4,245)
3. Bechmann, I., Steiner, B., Gimsa, U., Mor, G., Beyer, M., Zipp, F., Nitsch, F. (2000) Astrocyte-induced T cell apoptosis is FasL-dependent: (eingereicht)
4. Nitsch, R., Bechmann, I.*, Deisz, R.A., Haas, D., Lehmann, T.N., Wendling, U., Zipp, F. (2000) Cell death induced by tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in adult human brain tissue: *Lancet* 356: 827-828. (IF 11,793)
* equally contributing first author
5. Bechmann, I. and Nitsch, R. (1997) Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: combination of axonal tracing and lectin or immunostaining: *Histochem. Cell Biol.* 107:391-7. (IF 1,687)
6. Köbberts, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J.L., Mey, J., Thanos, S. (2000) Current concepts of neuroanatomical tracing: *Prog. Neurobiol.* 62(4): 327-351. (IF 7,090)
7. Bechmann, I. and Nitsch, R. (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion. A light, confocal and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique: *Glia* 20:145-154. (IF 3,67)
8. Hailer, P., Bechmann, I., Heizmann, S., Nitsch, R. (1997) Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons: *Hippocampus* 7:341-9. (IF 4,00)
9. Bechmann, I., Priller, J., Böntert, M., Wehner, T., Klett, F.F., Bohsung, J., Stuschke, M., Dirnagl, U., Nitsch, R. (2000) Immune surveillance of brain perivascular spaces by blood-borne macrophages: (*Eur. J. Neurosci.*, in Revision)
10. Bechmann, I., Kwidzinski, K., Kovac, A.D., Simbürger, E., Horvath, T., Gimsa, U., Dirnagl, U., Priller, J., Nitsch, R. (2000) Turnover of rat brain perivascular cells: *Exp. Neurol.* 168: 242-9 (2,863)
11. Bechmann, I., Peter, S., Beyer, M., Gimsa, U., Nitsch, R. (2000) Presence of B-7.2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin-phagocytosing MHC-II positive rat microglia is associated with non-destructive immune response in vivo: *FASEB J.* 15(6):1086-8. (IF 13,861)

Anhang

Danksagung

Allen voran gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. Robert Nitsch, der mich seit Beginn meiner wissenschaftlichen Arbeit 1993 im Dr. Senckenbergischen Institut für Anatomie in Frankfurt/Main begleitete. Mit ihm kam ich 1994 an die Charité und baute mit seiner großzügigen Unterstützung innerhalb der letzten Jahre meine durch die DFG und die Forschungskommission der Charité geförderte Gruppe auf. Diese besteht derzeit aus Frau Gisela Duwe und Frau Jacqueline Mahlo als MTAs, Herrn Dipl. Biol. Erik Kwidzinski als biologischer Doktorand und Frau cand. med. Barbara Steiner, Herrn cand. med. Adam Kovac und Herrn stud. med. Juri Bergmann als medizinische Doktoranden. Diesen Kolleginnen und Kollegen gilt ebenfalls mein herzlicher Dank.

Ich danke Herrn Professor Frederick Naftolin, Herrn Gil Mor, M.D. Ph.D., und Herrn Dr. Dr. Tamas Horvath, Yale University, Department OB/GYN und Section Neurobiology, für jahrelange fruchtbare Zusammenarbeit und großzügige Unterstützung.

Danke Frau PD Dr. med. Frauke Zipp, Neurologische Klinik der Charité, für unnachgiebige Kritik und fruchtbare Zusammenarbeit. Bei ihrem Mitarbeiter Herrn Dr. rer. nat. Uwe Wendling möchte ich mich für kompetente technische Unterstützung bedanken.

Danke den (ehemaligen) Kolleginnen und Kollegen unseres Institutes, insbesondere Frau Dr. rer. nat. Ulrike Gimsa, Frau Dipl. Biol. Susanne Peter, Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. Oliver Ullrich, Herrn Dr. rer. nat. Olaf Ninnemann, Herrn Dr. med. Nils Hailer und –nicht zuletzt– Herrn Dr. med. Frank Heppner für stimulierende Diskussionen und Hilfe in vielfältiger Weise.

Danke denjenigen, die mich in meinem Herzenswunsch bestärkten, trotz aller Unwegsamkeiten Anatom zu werden, insbesondere Herrn Prof. Dr. med. Robert Nitsch, Herrn Professor Dr. med. Thomas Georg Ohm, Herrn PD Dr. med. D.N. Angelov und Herrn Professor Dr. med. Michael Frotscher.

Für ihre Unterstützung und Geduld mit mir danke ich meinen Eltern, meiner Frau Zahra und meinem Sohn Omid, meinem Schwiegervater und meiner verstorbenen Schwiegermutter, der diese Arbeit gewidmet ist.

Lebenslauf

28.10.1968	Geburt in Coburg / Oberfranken
23.12.1995	Heirat mit der Zahnärztin Dr. med. dent. Zahra Shishechiha aus Quaszvin / Iran.
17.12.1996	Geburt des Kindes, Omid-Julian.
	Fremdsprachen: Englisch, Französisch, Farsi, Latein
AUSBILDUNG	
Mai 1989	Abitur am Gymnasium Casimirianum Coburg in den Fächern Deutsch, Latein, Ethik und Physik
Mai - Oktober 1989	Regie- und Dramaturgieassistent am Stadttheater Würzburg (Intendant: Dr. Tebbe Harms Kleen).
Oktober 1989 - Dezember 1990	Zivildienst am Landkrankenhaus Coburg als Pflegehelfer auf einer internistisch-geriatrischen Station.
Januar - März 1991	Pflegehelfer in der Chirurgischen Abteilung des St. Katharinen-Krankenhauses in Frankfurt am Main.
April 1991	Beginn des Studiums der Philosophie und der evangelischen Theologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main.
Oktober 1991	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main.
	Tätigkeit als Pflegehelfer im Zentrum für Psychiatrie der Universitätsklinik Frankfurt am Main, geschlossenen Abteilung für Männer, und in der kardiologischen Abteilung des Rot-Kreuz-Krankenhauses in Frankfurt am Main (bis August 1994).
September 1993	Physikum.
	Beginn wissenschaftlicher Arbeiten bei PD Dr. med. Thomas G. Ohm im Institut für Anatomie Frankfurt/Main.
August 1994	1. Staatsexamen.
Oktober 1994	Wechsel an die Charité zur Fortsetzung wissenschaftlicher Arbeiten bei Professor Dr. med. Robert Nitsch im Institut für Anatomie: Beginn der Dissertation.
Oktober 1994	Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes.
Februar bis April 1996	Forschungsaufenthalt im Labor von Professor Dr. Dr. Csaba Leranth, Professor of Neurobiology, Yale Medical School, New Haven: Kolokalisation von NPY- und GAD- positiven Neuronen in Nucleus arcuatus der Ratte. Beschäftigung mit Östrogen-induzierter Mikrogliaaktivierung im Nucleus arcuatus der Ratte.
März 1997	2. Staatsexamen.
April 1997- April 1998	Praktisches Jahr.
April 1998	3. Staatsexamen.
	Ärztliches Zeugnis; Teilapprobation als Arzt.
Mai 1998- Oktober 1999	Arzt im Praktikum in der Neurologischen Universitätsklinik Charité (Direktor: Prof. Dr. med. K. Einhäupl) und im Institut für Anatomie der Charité, AG Zell- und Neurobiologie (Leiter: Prof. Dr. med. R. Nitsch)

	Zell- und Neurobiologie (Leiter: Prof. Dr. med. R. Nitsch).
April 1999	Promotion zum Doctor medicinae an der Humboldt-Universität zu Berlin mit der Arbeit „Identifikation phagozytierender Gliazellen“ mit dem Prädikat <i>summa cum laude</i> .
Oktober 1999	Vollapprobation als Arzt.
Oktober 1999 – August 2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Anatomie der Charité, AG Zell- und Neurobiologie.
seit September 2000	Habilitationsstipendiat der Charité.

Famulaturen

Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie der Universitätsklinik Frankfurt am Main
(Direktor: Professor Dr. med. K. Hübner).

Chirurgische Abteilung des Kreiskrankenhauses Eichstätt
(Chefarzt: Dr. med. Sängler).

Praxis für Kernspintomographie, Coburg
(Dr. J. Romahn).

Gynäkologie und Geburtshilfe, Yale University Hospital, New Haven
(Chairman Professor Dr. Dr. F. Naftolin).

Abteilung für Geriatrie, Landkrankenhaus Coburg
(Leitender Arzt: Dr. med. J. Kraft).

Praktisches Jahr

1. Tertial:

Innere Medizin am Kreiskrankenhaus Gelnhausen
(Chefarzt: Professor Dr. med. H. von Lilienfeld-Toal).

2. Tertial

Gynäkologie und Geburtshilfe im Dept. of Gynecology and Obstetrics, Yale University Hospital, New Haven (Chairman: Professor Dr. Dr. Frederick Naftolin).

3. Tertial

Chirurgie am Kreiskrankenhaus Gelnhausen
[Chefärzte: Dr. med. T. Zoedler (Allgemeinchirurgie), Dr. Dr. med. J. Block (Traumatologie)].

Stipendien und Preise

Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes (von 1994 bis 1998).

Dr. Stöcker-Preis der Studienstiftung des Deutschen Volkes (1996).

Humboldt-Forschungsförderung, Stipendium der Humboldt-Universität (1996).

Yale-Fellows-Stipendium zur Fortführung 1996 begonnener wissenschaftlicher Arbeiten im Rahmen eines Tertials des Praktischen Jahrs (1997).

AIP-Stipendium der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin (1998/99).

Robert-Koch-Preis der medizinischen Fakultät Charité 1999:

Beste Promotionsarbeit der Fakultät.

Universitätspreis der Humboldt-Universität zu Berlin 1999:

Beste Promotionsarbeit der Universität.

Habilitationsstipendium der Charité (2000-2002).

Ernst-Bumm-Preis 2000:

Bester Nachwuchswissenschaftler der Charité;

Fünfter der Lehrevaluation an der Charité.

Forschungsaufenthalte

Februar - April 1997: Tamas Horvath, Csaba Leranth, Yale University.

August - Dezember 1998: Tamas Horvath, Gil Mor, Frederick Naftolin, Yale University.

März - April 2000: Tamas Horvath, Yale University.

Juli - August 2000: Tamas Horvath, Yale University.

Anatomischer Unterricht als studentische Hilfskraft

Präparierkurs:

Wintersemester 1993/94:

Prof. Dr. med. H. Braak, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Wintersemester 1994/95:

Prof. Dr. med. R. Nitsch, Humboldt-Universität zu Berlin.

Wintersemester 1995/96:

Prof. Dr. med. R. Nitsch, Humboldt-Universität zu Berlin.

Histologiekurs:

Sommersemester 1995

Prof. Dr. med. R. Nitsch, Prof. Dr. med. W. Richter, Humboldt-Universität zu Berlin.

Sommersemester 1996

Prof. Dr. med. R. Nitsch, Prof. Dr. med. T. G. Ohm, Humboldt-Universität zu Berlin.

als AIP/wissenschaftlicher Assistent/Habilitationsstipendiat

Präparierkurs:

Wintersemester 1998/99

Humboldt-Universität zu Berlin (Leiter des Präparierkurses: Prof. Dr. rer. nat. G. Bogusch).

Wintersemester 1999/2000

Humboldt-Universität zu Berlin (Leiter des Präparierkurses: Prof. Dr. rer. nat. G. Bogusch).

Wintersemester 2000/2001

Humboldt-Universität zu Berlin (Leiter des Präparierkurses für Zahnmediziner: PD Dr. med. G. Große).

Hirnkurs:

Wintersemester 1998/99

Humboldt-Universität zu Berlin (Leiter des Hirnkurses: Prof. Dr. med. R. Nitsch).

Wintersemester 1999/2000

Humboldt-Universität zu Berlin (Leiter des Hirnkurses: Prof. Dr. med. R. Nitsch).

Histologiekurs:

Sommersemester 1998

Humboldt-Universität zu Berlin (Leiter des Histologiekurses: Prof. Dr. med. T. G. Ohm).

Sommersemester 1999

Humboldt-Universität zu Berlin (Leiter des Histologiekurses: Prof. Dr. med. T. G. Ohm).

Sommersemester 2000

Humboldt-Universität zu Berlin (Leiter des Histologiekurses: Prof. Dr. med. T. G. Ohm).

Drittmittel

1998/99 AIP-Stipendium; Stipendium der Forschungskommission der Charité:
eigenes Gehalt;

1999-2001 Mikrogliaschwerpunkt (DFG I.B. 2272/1-1):
46.000,- DM konsumptiv, 1 BAT-0 Vc;

1999-2002 Habilitationsstipendium; Stipendium der Forschungskommission der Charité:
112.000,- DM konsumptiv und investiv, eigenes Gehalt, zwei BAT-2a ½;

Wissenschaftlicher Werdegang

Meinen ersten Kontakt zum wissenschaftlichen Arbeiten hatte ich nach dem Physikum 1993 im Dr. Senckenbergischen Institut für Anatomie in Frankfurt am Main im Labor von PD Dr. med. T. G. Ohm, bei dem ich auch meinen Präparierkurs absolviert hatte. Ich beschäftigte mich dort mit Einzelzell-Injektionen lipophiler Tracer in fixierte menschliche hippocampale Neurone. In dieser Zeit lernte ich Herrn Dr. med habil. Robert Nitsch kennen, der mich 1994 nach seiner Berufung zum Professor für Neuroanatomie an die Humboldt-Universität zu Berlin mitnahm. Unter seiner Betreuung erlernte ich die wesentlichen Techniken der stereotaktischen Tieroperation, des neuronalen Tracings und der Immunzytochemie für Licht-, Doppelfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie und begann meine Dissertationsarbeit zur Identifikation phagozytierender Gliazellen nach entorhinaler Läsion, die im März 1999 mit dem Prädikat *summa cum laude* abgeschlossen wurde.

1996 durfte ich zwei Monate im Labor des Morphologen Prof. Dr. Dr. Csaba Leranth an der Yale University verbringen. Dort kolokalisierte ich mit Hilfe der Mirror-Methode und Doppelfluoreszenz-Immunzytochemie NPY- und GABA-erge Neurone in Nucleus arcuatus der Ratte (Horvath et al. 1997) und arbeitete an der Östrogen-abhängigen Veränderung der Expression von Glutamat-Rezeptoren in diesem Kern mit. Während dieses Aufenthaltes lernte ich Herrn Professor Dr. Dr. Frederick Naftolin, Chairman des Departments of Gynecology and Obstetrics am Yale University Hospital, kennen. Unter seiner Betreuung arbeitete ich am Einfluß von Östrogen auf mikrogliale Aktivierung im sexuell dimorphen Nucleus arcuatus der Ratte (Mor et al. 1999). Aus den vorläufigen Befunden haben wir 1997 einen Antrag für einen NIH-Grant gestellt, der 1998 bewilligt wurde. Zur Fortsetzung dieses Projektes bekam ich ein Stipendium, um 1997 das zweite Tertial meines Praktischen Jahres in der Gynäkologie am Yale University Hospital zu verbringen. Durch das Zusammentreffen mit Immunologen des Departments, die sich mit dem Immunprivileg der Plazenta beschäftigen, begann ich in dieser Zeit, meine jetzige Fragestellung nach Mechanismen des Immunprivilegs im ZNS zu entwickeln.

Vom 01.05.1998 bis zum 31.10.1999 arbeitete ich als Arzt im Praktikum im Rahmen eines AIP-Stipendiums der Forschungskommission der Charité im Institut für Anatomie bei Professor Dr. Robert Nitsch und in der Neurologischen Klinik der Charité bei Professor Dr. Karl Einhüpl. Nachdem uns während des letzten Aufenthalts in Yale der Nachweis des Apoptose-induzierenden Proteins FasL auf Astrozyten im ZNS gelang (Bechmann et al. 1999; 2000), definierten wir nun die funktionelle Relevanz in Kokultursystemen FasL-defizienter im Vergleich zu nicht-defizienten Zellen. Wir konnten zeigen, daß FasL-defiziente Astrozyten etwa 20% niedrigere Apoptoseraten bei aktivierten T Zellen erzielen als nicht-defiziente Kontrollen (Bechmann et al., eingereicht). Ähnliche Befunde erhielten wir durch den Vergleich von Überlebensraten aktivierter T-Zellen auf FasL-defizienten und nicht-defizienten organotypischen Schnittkulturen. Die Regulation der Expression von Fas und FasL durch Cytokine wird in einer Kollaboration mit Professor Tamas Horvath und Professor Gil Mor von der Yale University derzeit untersucht.

Da die intrinsische Kapazität zentralnervösen Gewebes, aktivierte Lymphozyten zu töten, ein entscheidender Mechanismus zum Aufrechterhalten des Immunprivilegs im Gehirn darstellt, implizieren unsere bisherigen Befunde zweierlei: Zum einen nämlich, daß das Fas/FasL-System einen Beitrag zu dieser Kapazität leistet, andererseits aber auch, daß andere Todesrezeptor/Todesliganden-Systeme und/oder nicht-rezeptorvermittelte Apoptosewege wie der Perforinweg beteiligt sein müssen. Aus diesem Grund haben wir zunächst in Kollaboration mit Frau Privatdozentin Dr. Frauke Zipp aus der Neurologischen Klinik der Charité und Herrn Dr. Henning Walczak und Herrn Prof. Dr. Peter Krammer vom Deutschen Krebsforschungsinstitut die Expression eines weiteren Todesrezeptor/ Todesligandensystems, nämlich von TRAIL und TRAIL-R1-4 im intakten ZNS untersucht. In dieser Arbeit konnten wir die Expression der TRAIL-Rezeptoren 3 und 4 auf verschiedenen Zellpopulationen des ZNS nachweisen (Dörr et al., eingereicht), aber auch daß TRAIL selbst intrinsische Zellen des ZNS zu töten vermag (Nitsch et al. 2000).

Eine weitere, von uns im Rahmen eines DFG-Projektes (Be 2272/1-1) untersuchte Möglichkeit der Induktion von Anergie/Apoptose aktivierter T Zellen besteht in der Präsentation von Antigenen über MHC-II Moleküle bei fehlender Kostimulation über den B7-CD28-Weg. Wir fanden, daß Myelin-phagozytierende Mikroglia Antigene über B7-2, nicht aber über B7-1 präsentiert; eine solcher Immunphänotyp wird mit neuroprotektiven Immunantworten in Zusammenhang gebracht

(Bechmann et al. 2001). Inwieweit axonale Läsion in der Tat die Entwicklung autoimmuner Erkrankungen des ZNS zu verhindern vermag, wird derzeit von uns untersucht.

5 Eidestattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig verfaßt. Sie faßt sieben von mir als Erstautor oder gleichberechtigter Erstautor erstellte Arbeiten (Bechmann und Nitsch 1997a, Bechmann und Nitsch 1997b, Bechmann et al. 1999, Bechmann et al., 2000, Nitsch et al. 2000, Bechmann et al. 2001a, 2001b), einen Beitrag zu einer Übersichtsarbeit neuroanatomischer Färbemethoden (Köbber et al. 2000), eine in Kollaboration mit Herrn Dr. med. Nils Hailer entstandene Arbeit (Hailer et al. 1997) sowie zwei von mir erstellte und derzeit begutachtete Manuskripte zusammen, die sich alle mit den Mechanismen des Immunprivilegs nach axonaler Degeneration bzw. mit Methoden ihrer Erforschung beschäftigen. Eine der beiden eingereichten Arbeiten (Referenz 7) wurde in enger Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Josef Priller und Herrn Professor Dr. med. Ulrich Dirnagl durchgeführt. Einige Daten aus unserem Labor, die unter meiner Federführung entstanden und die noch nicht zur Publikation eingereicht sind, werden ebenfalls dargestellt. Aus einer in Kollaboration mit PD Dr. Frauke Zipp entstandenen Arbeit (Dörr et al., eingereicht) sind die in unserem Labor gewonnenen Daten besprochen. Diese Ergebnisse sind dann ausführlich dokumentiert, während sich bereits publizierte oder von mir zu Publikation eingereichte Daten im Detail in den im Anhang befindlichen Originalarbeiten (Referenzen) nachlesen lassen. Dort finden sich auch die Beschreibung der verwendeten Methoden.

Neben Herrn Professor Dr. med. Robert Nitsch, dem Leiter der Arbeitsgruppe Zell- und Neurobiologie der Charité, in der ich als AIP-Forschungsstipendiat, Wissenschaftlicher Assistent und Habilitationsstipendiat der Charité den Großteil der hier vorgestellten Untersuchungen durchgeführt habe, waren Frau PD Dr. med. Frauke Zipp (Neurologische Klinik der Charité) und Gil Mor, M.D. Ph.D., (Yale University, Reproductive Immunology) wichtige Partner.

Weitere Kolleginnen und Kollegen, die mich durch Diskussion und technische Beiträge unterstützt haben, sind in der Danksagung erwähnt.